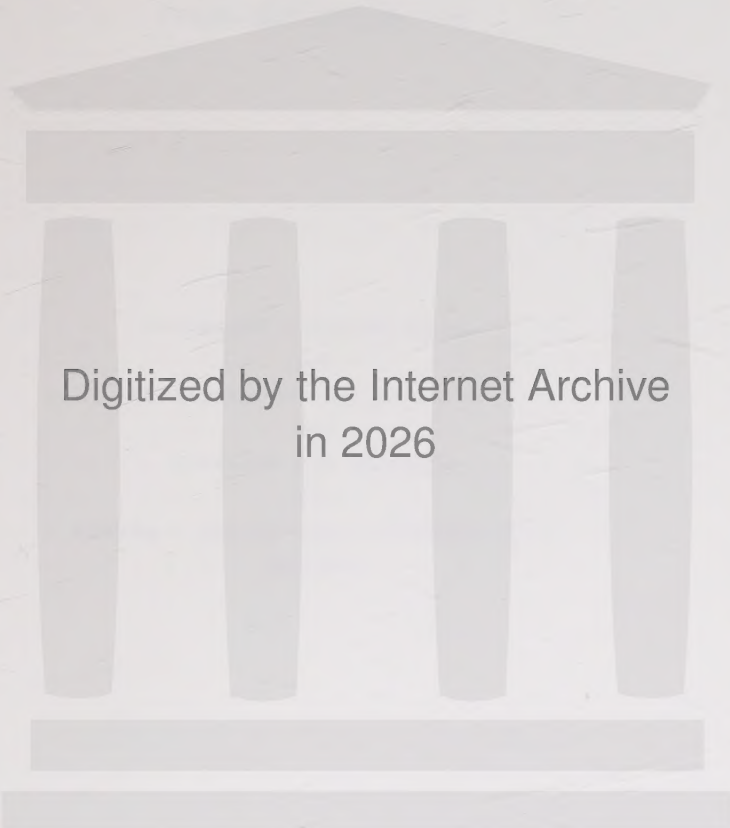


IMMUNOLOGISCHE VERWANDTSCHAFT
UND
QUARTARSTRUKTUR
VON
CRUSTACEEN-HÄMOCYANINEN

WALTER STOCKER

*Das
München
1926*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0019

IMMUNOLOGISCHE VERWANDTSCHAFT
UND
QUARTÄRSTRUKTUR
VON
CRUSTACEEN-HÄMOCYANINEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von Walter Stöcker
aus Markt Bibart

Juni 1984

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Markl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1984

D A N K S A G U N G

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Priv.Doiz.Dr.Jürgen Markl durchgeführt.

Besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr.Jürgen Markl. Seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Hilfsbereitschaft und sein freundschaftlicher Rat haben meine Arbeit entscheidend gefördert.

Bei Prof.Dr.Bernt Linzen bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ich bedanke mich bei Prof.Dr.Ernst F.J. van Bruggen (Niederlande) für einen einwöchigen Aufenthalt in seinem Labor in Groningen, der meine Arbeit wesentlich bereicherte.

Für die in Groningen durchgeführten elektronenmikroskopischen Versuche möchte ich mich bei Frau Martha M.C. Bijlholt, Frau Wilma G. Schutter und Frau Trijntje Wichertjes bedanken sowie bei Herrn Klaas Gilissen, der die EM-Fotoarbeiten durchführte.

Bei Herrn Peter Nahke und Herrn Thomas Leidescher bedanke ich mich für die Durchführung von Atomabsorptionsanalysen.

Für die Überlassung von Krill-Blut bedanke ich mich bei Herrn Dr.Christopher Bridges (Universität Düsseldorf). Prof.Dr.Joseph Bonaventura (Beaufort, USA) verdanke ich Hämolymphe der Languste PANULIRUS. Die Untereinheit 80K aus PANULIRUS-Hämocyanin erhielt ich von Prof.Dr.Ernst F.J. van Bruggen. Von Herrn Bruce Johnson (Beaufort,USA) bekam ich dankenswerterweise Hämocyanin aus der Krabbe OCYPODE.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, besonders aber bei Herrn Peter Nahke, Herrn Dr. Bernhard Kempfer und Frau Anette Savel für die über Jahre sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken sowie bei Frau Heide Storz, die mir bei der Herstellung der Zeichnungen behilflich war.

E I N L E I T U N G.....	1
M A T E R I A L U N D M E T H O D E N.....	4
1. CHEMIKALIEN.....	4
2. TIERE, TIERHALTUNG UND HÄMOLYPHE-GEWINNUNG.....	4
3. ANALYTIK.....	6
4. KONZENTRIEREN VON PROTEINPROBEN.....	6
5. DIALYSEN, DISSOZIIATION, REASSOZIIATION.....	7
6. ELEKTROPHORETISCHE METHODEN.....	7
a) Analytische Disc-Elektrophorese.....	7
b) Mikropräparative Disc-Elektrophorese.....	8
c) Präparative Disc-Elektrophorese.....	9
d) Molekulargewichtsbestimmung.....	9
7. GELCHROMATOGRAPHIE.....	9
8. IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE.....	10
9. ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION.....	10
10. ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	11
11. IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	11
1. Kaninchenimmunisierung und Gewinnung von Antiseren.....	11
2. Geldiffusion nach Ouchterlony (1958).....	11
3. Immuielektrophorese nach Grabar und Williams (1953).....	12
4. Zweidimensionale Immuielektrophorese.....	12
5. Rocket-Immuielektrophorese.....	14
6. Fused-Rocket-Immuielektrophorese.....	14
7. Spot-Technik.....	14
8. Quantifizierung der Antigen-Fab- und der Antigen-IgG- Wechselwirkung nach Loft (1975).....	15
9. Gewinnung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum.....	15
10. Isolierung der Hämocyanin-spezifischen IgG durch Affinitätschromatographie.....	15
a) Herstellung der Kopplungsmatrix durch Bromcyan- kopplung.....	15
b) Affinitätschromatographie.....	16
11. Gewinnung von Fab-Fragmenten durch Papainspaltung....	17
E R G E B N I S S E	18
A) CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN HÄMOCYANINE UND ISOLIERUNG DER UNTEREINHEITEN.....	18
1. Hämocyanin aus ASTACUS LEPTODACTYLUS (Abt. Astacura).....	18
a) Bisherige Befunde.....	18
b) Isolierung der dimeren Untereinheit.....	18
c) Isolierung der monomeren Untereinheiten.....	22
d) Vergleich mit dem Hämocyanin aus CHERAX DESTRUCTOR.....	25
2. Hämocyanin aus HOMARUS AMERICANUS (Abt. Astacura).....	26
a) Bisherige Befunde.....	26
b) Isolierung des 24S-Hämocyanins und Untersuchung des nicht-respiratorischen 16S-Proteins (NRP-1).....	26
c) Dissoziations- und Denaturierungsprobleme beim 24S-Hämocyanin.....	28
d) Die Zahl der Untereinheiten im Hämocyanin aus HOMARUS.....	30
e) Isolierung der Untereinheiten im präparativen Maßstab.....	33
3. Hämocyanin aus den Krabben CANCER PAGURUS und OCYPODE QUADRATA (Abt. Brachyura).....	36
a) Bisherige Befunde.....	36

b)	Isolierung und Zuordnung der Untereinheiten aus CANCER-Hämocyanin.....	37
c)	Die Untereinheiten des Hämocyanins aus OCYPODE.....	41
4.	Die Hämocyanine aus den Langusten PALINURUS VULGARIS und PANULIRUS INTERRUPTUS (Abt. Palinura).....	44
a)	Bisherige Befunde.....	44
b)	Eigene Ergebnisse.....	44
5.	Hämocyanin aus PAGURUS BERNHARDUS und GALATHEA SQUAMOSA (Abt. Anomura).....	46
a)	Bisherige Befunde.....	46
b)	Analyse der Untereinheiten.....	47
6.	Hämocyanin aus der Garnele PALAEMON FABRICII.....	52
a)	Bisherige Befunde.....	52
b)	Eigene Untersuchungen.....	52
7.	Hämocyanin aus dem antarktischen Krill, EUPHAUSIA SUPERBA.....	54
a)	Bisherige Befunde.....	54
b)	Isolierung des Krill-Hämocyanins.....	55
c)	Analyse der Untereinheiten.....	55
B)	ZWISCHENARTLICHE KORRELATION DER HÄMOCYANIN-UNTEREINHEITEN.....	58
1.	Stand der Forschung.....	58
2.	Zur Methodik.....	59
3.	Ausgangspunkt: das Hämocyanin der brachyuren Krabben.....	60
4.	Korrelation zwischen HOMARUS-, ASTACUS- und CANCER-Hämocyanin.....	61
5.	Die Zuordnung der Langusten-Hämocyanine.....	64
6.	Die Einordnung der Hämocyanine der Anomura.....	68
7.	Zuordnung des Hämocyanins aus der Garnele PALAEMON.....	68
8.	Die Stellung des Hämocyanins aus dem Krill EUPHAUSIA SUPERBA.....	70
9.	Kreuzreaktionen mit den Hämocyaninen aus Cheliceraten.....	72
C)	DIE QUARTÄRSTRUKTUR DER DODEKAMEREN HÄMOCYANINE AUS ASTACUS, HOMARUS UND CANCER.....	75
1.	Bisherige Befunde.....	75
2.	Stöchiometrie der Untereinheiten in den Dodekameren.....	77
3.	Gewinnung und Untersuchung von Dissoziationszwischen- stufen.....	78
a)	HOMARUS AMERICANUS 24S-Hämocyanin.....	78
b)	CANCER PAGURUS 24S-Hämocyanin.....	79
c)	ASTACUS LEPTODACTYLUS 24S-Hämocyanin.....	79
4.	Reassoziationsexperimente.....	82
a)	ASTACUS-Hämocyanin.....	83
b)	CANCER-Hämocyanin.....	88
c)	HOMARUS-Hämocyanin.....	91
5.	Lokalisierung einzelner Untereinheiten durch Immunelektronenmikroskopie.....	94
a)	Lokalisierung der Untereinheiten im CANCER 24S-Hämocyanin.....	96
b)	HOMARUS-Hämocyanin.....	96
c)	ASTACUS-Hämocyanin.....	99
6.	Modellvorschläge für die 24S-Hämocyanine.....	99

D I S K U S S I O N.....	101
1. Die Tendenz der Untereinheiten zur Denaturierung.....	101
2. Die Rolle der Untereinheiten beim Aufbau der Quartärstruktur.....	104
a) Die Dissoziation der Hämocyanin-Oligomere.....	104
b) Die Reassoziatio n der Hämocyanine aus ASTACUS, CANCER und HOMARUS.....	105
c) Diskussion der Ergebnisse aus Immuno-Markierungs- Experimenten und Reassoziationsversuchen für die einzelnen Untereinheiten.....	107
3. Die Zahl der Untereinheiten.....	111
4. Immunologische Verwandtschaftsanalysen.....	114
Z U S A M M E N F A S S U N G.....	121
L I T E R A T U R	124

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AST	dissoziiertes ASTACUS-24S-Hämocyanin
CAN	" CANCER- " "
EUPH	EUPHAUSIA-16S- "
GAL	" GALATHEA- "
HOM	" HOMARUS-24S- "
OCY	" OCYPODE- "
PAG	" PAGURUS- "
PAL	" PALINURUS-16S- "
PALAE	" PALAEMON- " "
PAN	" PANULIRUS- " "
a - AST	Antiserum gegen dissoziiertes ASTACUS-24S- Hämocyanin (übrige Antiseren dementsprechend)
Coomassie BB	Coomassie Brilliant Blue
BSA	Rinder serumalbumin
EM	Elektronenmikroskop
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
Hc	Hämocyanin
IE	Immunoelektrophorese
IgG	Immunglobulin G
Min.	Minute
Mr	relative Molekülmasse
NRP	nicht-respiratorisches Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
SDS	Natriumdodecylsulfat
UE	Untereinheit

E I N L E I T U N G.

Bei zahlreichen Gruppen der Mollusken und der Arthropoden dienen frei in der Hämolymphe gelöste Hämocyaninmoleküle dem Sauerstofftransport. Diese Proteine zeichnen sich aus durch sehr hohe Molekulargewichte (bis zu 8 Millionen), eine komplexe Quartärstruktur, ausgeprägte allosterische Eigenschaften sowie ein kupferhaltiges aktives Zentrum; der Kupfer/Sauerstoffkomplex ist für ihre blaue Farbe verantwortlich (Review: Van Holde und van Bruggen, 1971). Trotz funktioneller Gemeinsamkeiten bestehen ausgeprägte strukturelle Unterschiede zwischen den Hämocyaninen der beiden Tierstämme (Review: Van Holde und Miller, 1982). Die Hämocyanine der Arthropoden sind oligo-hexamere Aggregate von Polypeptidketten (= Monomeren) mit Molekulargewichten von ca. 75000 und Sedimentationskoeffizienten von 5S. Jedes Monomer besitzt ein aktives, sauerstoffbindendes Zentrum aus zwei Kupferionen. Die Tertiärstruktur der Monomere wurde durch Röntgenstrukturanalyse eines Langusten-Hämocyanins untersucht (van Schaick et al., 1981; Gaykema et al., 1983a,b). Seit neuestem liegen die kompletten Primärstrukturdaten zweier Polypeptidketten des Vogelspinnen-Hämocyanins vor (Schneider et al., 1983; Schartau et al., 1983). Je 6 Monomere bilden in Form eines trigonalen Antiprismas mit 100 Angström Kantenlänge die kleinste native Einheit, die mit ca. 16S sedimentiert und ein Molekulargewicht von 450000 besitzt. Zahlreiche Crustaceen enthalten ausschließlich hexameres Hämocyanin. Bei anderen tritt zusätzlich oder ausschließlich ein dodekames Aggregat auf, welches mit ca. 24S sedimentiert und sich morphologisch aus zwei Hexameren zusammensetzt (Van Holde und van Bruggen, 1971). Höher aggregierte Oligo-Hexamere sind bei den Cheliceraten sehr verbreitet (Markl et al., 1979a). Innerhalb der Crustaceen wurde bei Flußkrebsen ein geringer Anteil eines 29S-Moleküls (Jeffrey et al., 1978; Gondko und Michalak, 1981) und bei *CANCER PAGURUS* Spuren von 33S-Hämocyanin beschrieben (Eriksson-Quensel und Svedberg, 1936). Daß der Hauptanteil des Hämocyanins jedoch größer als dodekamer war, fand sich bisher nur bei Maulwurfskrebsen (Fam. *Thalassinidae*) (Roxby et al., 1974; Miller et al., 1977). Dabei handelt es sich um einen aus vier Hexameren aufgebauten Tetraeder, der mit 39S sedimentiert (van Bruggen, 1983).

Zusammenfassende neuere Reviewartikel stammen von Van Holde und Miller (1982), Ellerton et al. (1983) sowie Mangum (1983). Bei Erhöhung des pH über 9 dissoziieren die Hämocyanin-Oligomere in die konstituierenden Untereinheiten, bei denen es sich hauptsächlich um Monomere (5S) handelt. Bei verschiedenen Hämocyaninen wurden daneben auch dimere Untereinheiten (7S) beobachtet (z.B. Murray and Jeffrey, 1974; Markl et al., 1979a,b; Lamy et al., 1979a). Die Dissoziation ist in der Regel bei Rückdialyse gegen neutrale Puffer reversibel. Die Homogenität des nativen Oligomers wurde bisher lediglich bei der Vogelspinne EURYPELMA definitiv nachgewiesen (Markl et al., 1980). Umgekehrt berichten von multiplen Oligomeren nur Jeffrey et al. (1976) sowie van den Berg et al. (1977) im Fall des Flußkrebsses CHERAX DESTRUCTOR bzw. der Languste PANULIRUS INTERRUPTUS. Eine ausgeprägte Heterogenität findet man auf dem Untereinheitenniveau (Review: Linzen, 1983). Bei verschiedenen Crustaceen-Hämocyaninen wurden mit elektrophoretischen Methoden zwischen 2 und 6 distinkte Monomere gefunden (Busselen, 1970; Loehr und Mason, 1973; Murray und Jeffrey, 1974; Roxby et al., 1974; Robinson und Ellerton, 1977; Hamlin und Fish, 1977; Brouwer et al., 1978; Rochu et al., 1978; Terwilliger et al., 1979; Markl et al., 1979b; Larson et al., 1981; Van Holde und Brenowitz, 1981; Ellerton und Anderson, 1981; Jeffrey et al., 1981; Marlborough et al., 1981; van Eerd und Folkerts, 1981; Zatta und Salvato, 1981). Die chemische Basis dieser Heterogenität liefern zumindest bei den Cheliceraten Unterschiede in der Primärstruktur der einzelnen Untereinheiten (Sullivan et al., 1976; Markl et al., 1979c; Jolles et al., 1979; Schneider et al., 1983; Schartau et al., 1983). Mangelnde Kenntnis der Aminosäuresequenzen von Crustaceen-Hämocyaninen läßt dagegen noch keine Aussagen dieser Art zu. Bisher wurden lediglich Primärstrukturanalysen des Hämocyanins von PANULIRUS publiziert (z.B. Vereijken, 1983).

Bei den Cheliceraten unterscheiden sich die Untereinheiten nicht nur elektrophoretisch, sondern sie sind auch immunologisch völlig verschieden (Lamy et al., 1979a,b,c). Die einzelnen Typen spielen unterschiedliche Rollen beim Aufbau der komplexen oligomeren Architektur, was in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde und mit der Entwicklung detaillierter topologischer Modelle der Quartärstruktur abschloß (Markl, 1980; Lamy et al., 1981b;

Markl et al., 1981a; Sizaret et al., 1982; Lamy et al., 1983a). Über Crustaceen-Hämocyanine liegen diesbezüglich weit weniger Daten vor (Reviews: Linzen, 1983; Ellerton et al., 1983; Mangum, 1983). Immunologische Untersuchungen am Hämocyanin dieser Tiergruppe sind zwar zahlreich (vgl. Kap.B.1: "Stand der Forschung"), Versuche mit einzeln isolierten Untereinheiten haben jedoch nur Jeffrey et al. (1981) an CHERAX, Folkerts und van Eerd (1981) an PANULIRUS sowie Markl und Kempster (1981a,b) an sechs weiteren Reptantia durchgeführt. Hinweise auf interspezifische Kreuzreaktionen zwischen einzelnen Hämocyanin-Untereinheiten aus Krebsen stammen von Rochu und Fine (1978) sowie von Markl und Kempster (1981b). Markl und Kempster (1981b) stießen auf das Phänomen, daß beim Hämocyanin der Brachyuren zwei Formen von Untereinheiten auftreten. Die eine fand sich in immunologisch ähnlicher Form bei allen drei untersuchten Krabbenarten und kann daher als phylogenetisch konservativ gelten. Der zweite, immunologisch distinkte Untereinheitentyp erwies sich dagegen als interspezifisch variabel. Bezüglich der Rolle einzelner Untereinheiten beim Aufbau der Quartärstruktur von Crustaceen-Hämocyaninen gab es zu Beginn meiner Arbeit den Hinweis von Jeffrey (1979), daß bei CHERAX das Dodekamer vermutlich durch eine Disulfidbrücke zwischen den hexameren Hälften stabilisiert wird.

Die vorliegende Arbeit knüpft an die früheren Untersuchungen von Markl et al. (1979b) sowie Markl und Kempster (1981a,b) am Hämocyanin aus Crustaceen an. Insbesondere sollte auf folgende Fragen Antwort gesucht werden: Wieviele immunologisch distinkte Untereinheiten sind bei den einzelnen Hämocyaninen tatsächlich vorhanden? Wie ausgeprägt sind die zwischenartlichen immunologischen Kreuzreaktionen zwischen den Hämocyanin-Untereinheiten? Existiert das Phänomen der konservativen und variablen Untereinheiten auch außerhalb der brachyuren Krabben? Läßt sich hieraus eine Vorstellung über die Evolution der Krebs-Hämocyanine entwickeln? Lassen sich topologische Modelle der Quartärstruktur entwerfen? Und schließlich: Ist hieraus ein gemeinsames Bauprinzip der Crustaceen-Hämocyanine zu erkennen?

Den einzelnen Abschnitten des Ergebnisteils sind jeweils noch spezielle Einleitungen zum Stand der Forschung vorangestellt.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. CHEMIKALIEN

Die verwendeten Reagenzien waren von p.A. Qualität. Sie wurden von den Firmen Merck und Fluka bezogen mit Ausnahme von:

Anti-Rabbit Gammaglobulin (Ziege)	Behringwerke (Frankfurt)
Biogel A5m 200-400 mesh	Biorad (Richmond, USA)
Biogel A1,5m	"
Narcoren	Jafa-Merieux (Laupheim)
Agarose M	LKB (Bromma, Schweden)
Papain	Millipore (Freehold, USA)
DEAE-Sephadex CL-6B	Pharmacia (Uppsala,
Sephadex G100sf und G200sf	" Schweden)
Coomassie BB G250	Serva (Heidelberg)
Polyethylenglycol (PEG)	"
Natriumdodecylsulfat (SDS)	"
Visking Dialysierschläuche	"
Bromcyan	Sigma (Taufkirchen)
Eichproteine	Boehringer (Mannheim)
Filterpapier Whatman 1 und 3MM	Vetter (Wiesloch)
Freunds Adjuvans "Bactoccomplete"	Difco (Detroit, USA)
Seakem Gel-Bond-Film	Johnson (Hilden)

2. TIERE, TIERHALTUNG UND HÄMOLYMPHEGEWINNUNG

Der europäische Flußkrebs *ASTACUS LEPTODACTYLUS* ("Galizier"; Fam. Astacidae), der nordamerikanische Hummer *HOMARUS AMERICANUS* (Fam. Homaridae) und die europäische Languste *PALINURUS VULGARIS* (Fam. Palinuridae) wurden in München bei den Firmen Hertie, Käfer und Dallmayr gekauft. Der europäische Taschenkrebs *CANCER PAGURUS* ("Knieper"; Fam. Cancridae) wurde von der Biologischen Anstalt Helgoland bezogen. Der Einsiedlerkrebs *PAGURUS BERNHARDUS* (Fam. Paguridae) der Furchenkrebs *GALATHEA SQUAMOSA* (Fam. Galatheididae) wurden vor Helgoland unter Wasser gesammelt. Die amerikanische Languste *PANULIRUS INTERRUPTUS* wurde von Prof. Bonaventura (Beaufort, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Blutentnahme und Weiterverarbeitung bis zum Erhalt des Pellets erfolgten teils durch mich in München, teils durch Herrn Dr. Jürgen Markl in Helgoland und Beaufort. Die Tiere wurden im lebenden Zustand in Eis unterkühlt um sie immobil zu machen und anschließend weitgehend entblutet wie folgt: Bei CANCER wurde ein Laufbein-Femur median quer durchschnitten und das Tier über den Beinstumpf ausgeblutet. Dieses Verfahren hat sich in unserem Labor speziell bei großen Krabben gut bewährt, ist jedoch bei sehr kleinen Exemplaren sowie bei den übrigen Reptantia weniger erfolgreich. Hier wurde mit einer Kanüle entweder eine der Laufbein-Coxen punktiert oder - durch einen flachen Einstich vom dritten Schwanzsegment her - der ventral gelegene Abdominalsinus. Die Tiere wurden anschließend durch Unterkühlen bei minus 25 Grad getötet. ASTACUS konnte im Süßwasseraquarium des Instituts monatelang gehalten werden und überstand die in etwa vierteljährlichen Abständen erfolgende Abnahme von jeweils 3-6 ml Hämolymphe meist gut.

Das Blut gerann bei allen Tieren in der Regel sehr rasch. Zellen und Coagel wurden sofort durch Zentrifugation bei 12000 x g entfernt. Das Hämocyanin als schwerste Komponente des verbleibenden Serums wurde durch präparative Ultrazentrifugation bei 200000 x g absedimentiert und ergab ein blaugrünes Pellet (Beckman Modell L Ultrazentrifuge; 40000 UpM, 6-18 Stunden, 2 Grad Celsius). Im Fall von HOMARUS, CANCER, OCYPODE, GALATHEA und PAGURUS bildeten hochmolekulare, rot gefärbte Proteine ein zweites, lockeres Pellet, welches mittels einer Pipette vom Hämocyanin abgenommen werden konnte. Das Hämocyanin-Pellet wurde in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, 10 mM Calciumchlorid in einer Konzentration von 20-60 mg/ml aufgenommen und entweder sofort verwendet oder für wenige Tage bei +4 Grad gelagert oder über einige Wochen hinweg bei -25 Grad eingefroren. Längerfristig wurden die Proben in flüssiger Luft aufbewahrt. Durch Ultrazentrifugation isoliertes Hämocyanin der Garnele PALAEMON FABRICII (Fam. Palaemonidae) erhielt ich von Dr. Christopher Bridges von der Universität Düsseldorf. Auf gleiche Weise vorgereinigtes Hämocyanin der nordamerikanischen Geisterkrabbe OCYPODE QUADRATA stammte von Prof. Joseph Bonaventura von der DUKE University in Beaufort, USA. Schließlich erhielt ich durch Herrn Dr. Bridges in der Antarktis gewonnene Hämolymphe der Leuchtgarnele EUPHAUSIA SUPERBA (antark-

tischer Krill). Diese wurde im gefrorenen Zustand nach München transportiert und dort von mir wie im Ergebnisteil beschrieben durch Gelfiltration weiter aufgearbeitet. Später sandte mir Dr. Bridges noch durch Gelfiltration frischen Krill-Materials isolierte Hämocyaninfraktionen.

Die Antiseren wurden aus ca. 3 Monate alten weiblichen Kaninchen der Rasse "Chinchilla-Bastard" gewonnen, die von der Firma Imrich (Putzbrunn) bezogen wurden. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen nach Chase (1967) gehalten und mit Standard-Diät (Kaninchen) der Firma Altromin (Lage) gefüttert.

3. ANALYTIK

Die UV-Spektren wurden mit einem Cary 118 Photometer der Firma Varian aufgenommen.

Der Hämocyaningehalt von Lösungen wurde routinemäßig durch Messung der UV-Extinktion bei 280 nm bestimmt, wobei nach Loewe und Linzen (1973) 1 OD etwa 1mg/ml entspricht. Waren genauere Werte nötig, so wurde die Biuret-Methode angewendet.

Quantitative Kupferanalysen wurden von Herrn Peter Nahke und Herrn Thomas Leidescher durchgeführt. Verwendet wurde die flammenlose Atomabsorptions-Spektroskopie mit einem Gerät der Firma Perkin-Elmer vom Typ 400.

Die quantitative Auswertung von Elutionsprofilen und zweidimensionalen immunologischen Mustern geschah durch planimetrische Flächenintegration. Dafür stand ein Computer TEK 31 (Firma Tektronix) mit angeschlossenem Digitalisierungstablett (Firma Summagraphics) zur Verfügung sowie ein von Decker (1981) entwickeltes Programm.

4. KONZENTRIEREN VON PROTEINPROBEN

Zum Einengen wurden gepufferte Proteinlösungen gegen eine 25%-ige Lösung von Polyäthylenglycol 20000 im selben Puffer dialysiert. Große Volumina stark verdünnter Lösungen wurden im Wasserstrahlvakuum durch Unterdruckfiltration konzentriert, wobei sich das Protein in einem ca. 50 cm langen Dialyseschlauch befand, der

wiederum in einer Glasröhre von 10 cm Durchmesser hing. Das Rohr war beidseitig durch Gummistopfen verschlossen und wurde über ein Glasrohr mit einem Durchmesser von 1 cm evakuiert. Das Innere des Dialyseschlauchs mit der Proteinprobe stand über ein zweites derartiges Glasrohr mit der Außenluft in Verbindung.

Als dritte Methode wurde das verdünnte Protein an den Anionenaustauscher DEAE-Sepharose CL-6B gebunden wie unter 8. beschrieben. Dabei handelte es sich um eine Pasteurpipette, die ca. 2 cm hoch mit Austauschermaterial gefüllt war. Mit 0,6 M NaCl wurde das Protein in konzentrierter Form abgelöst.

5. DIALYSEN, DISSOZIATION, REASSOZIATION

Zur Dissoziation des Hämocyanins in Untereinheiten wurden Proben mit einer Konzentration von 3-10 mg/ml über 24 Stunden bei Raumtemperatur gegen den mindestens 1000-fachen Überschuß eines der folgenden Puffersysteme dialysiert:

Glycin/NaOH, pH 9,6, I = 0,05, 10 mM EDTA

Natriumhydrogencarbonat/carbonat, I = 0,1, pH 10,1, 10 mM EDTA
0,05 M Tris/HCl, pH 8,8, 1 mM EDTA.

Zur Reassoziaton der Hämocyanin-Oligomere aus Untereinheiten wurden Proben mit einer Konzentration von 1-2 mg/ml über 1 Woche bei 4 Grad Celsius gegen 0,1 M Tris/HCl von pH 7,5 dialysiert. Der Puffer enthielt zusätzlich 10 mM oder 40 mM Calciumchlorid oder 10 mM Magnesiumchlorid oder 4 mM Calciumchlorid plus 1 mM Magnesiumchlorid.

6. ELEKTROPHORETISCHE METHODEN

a) Analytische Disc-Elektrophorese

Analytische Disc-Elektrophoresen (PAGE) wurden in einer Platten-gel-Apparatur der Firma Hölzel (Dorfen) durchgeführt. Verwendet wurden 1,5 mm starke Polyacrylamidplattengele in vertikaler Anordnung mit 18 Probestaschen. Die Konzentration des Acrylamids betrug in kontinuierlichen Gelen 3,7-7,5 %, bei Gradientengelen 5-10 %, 5-15 % oder 10-20 %. Die Elektrophoresedauer betrug

entweder 14 Stunden bei 60-70 Volt oder 5 Stunden bei 200-250 Volt.

SDS-Elektrophoresen wurden im System nach Laemmli (1970) bei pH 8,8 durchgeführt, wobei das 3 %-ige Sammelgel einen pH von 6,8 aufwies. Die Proteine wurden 20 Minuten bei 56 Grad in 2 % SDS und 10 % β -Mercaptoäthanol denaturiert. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 1 Mikrogramm pro erwarteter Bande.

Die Elektrophorese nativer Proteine erfolgte entweder bei pH 7,5 im System Nr.6 nach Maurer (1968) oder unter den Bedingungen von Laemmli (1970) unter Verzicht auf SDS und β -Mercaptoäthanol ("native PAGE"). Z.T. wurde ein 3 %-iges Sammelgel von pH 6,8 (manchmal auch pH 8,8) verwendet. Pro erwarteter Bande wurden ca. 5 Mikrogramm Protein aufgetragen.

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie BB G250 nach Bramhall et al. (1969) bzw. Weber und Osborn (1969), modifiziert durch Kahn und Rubin (1975).

b) Mikropräparative Disc-Elektrophorese

Zur Isolierung geringer Mengen reiner Proteine wurde ebenfalls die Apparatur der Firma Hölzel und das System von Laemmli (1970) verwendet, und zwar ohne Sammelgel und mit einem 7,5 %-igen Trenngel. Es wurden keine Probentaschen gegossen, sondern das Protein (2-4 mg) über die ganze Gelbreite aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden Rand- und Mittelstreifen aus dem Gel geschnitten und gefärbt. Die gefärbten Streifen wurden wieder eingepaßt. Auf diese Weise konnten die noch ungefärbten Proteinbanden im Hauptgel lokalisiert und herausgeschnitten werden. Das Gelmaterial mit den Banden wurde in eine Spritze gefüllt und zur Homogenisierung durch eine Kanüle von 1 mm Durchmesser passiert. Anschließend wurde das Protein über Nacht bei 4 Grad in 0,05 M Tris/HCl-Puffer von pH 8,8 (1 mM EDTA) eluiert. Die Abtrennung der Gelpartikel erfolgte durch Filtration über Gazefilter der Firma LKB sowie Zentrifugation des Filtrats bei 12000 x g (Eppendorf-Zentrifuge).

c) Präparative Disc-Elektrophorese

Die elektrophoretische Isolierung von Proteinen im größeren Maßstab wurde in einer Ultraphor-Apparatur der Firma Colora (Lorch) nach Firmenanleitung durchgeführt. Wie bei Schneider et al. (1977) wurde das Gelsystem Nr.1 von Maurer (1968) verwendet. Die Gelhöhe des 6 %-igen Polyacrylamidgels betrug 8 cm, die maximal aufgetragene Proteinmenge 80 mg.

d) Molekulargewichtsbestimmung

Molekulargewichtsbestimmungen von Polypeptidketten wurden nach Weber und Osborn (1969) in SDS-Gelen (6,a) durchgeführt. Zur Ermittlung der Untereinheitenzahl in Oligomeren wurde die Methode von Hedrick und Smith (1968) im nicht-denaturierenden PAGE-System von Laemmli (1970) (6,a) herangezogen.

7. GELCHROMATOGRAPHIE

Gelfiltrationen zur Proteinisolierung wurden in einer Säule von 180 x 1,5 cm durchgeführt. Je nach Trennproblem wurde entweder Biogel A5m in 0,1 M Tris/HCl-Puffer von pH 7,5 (10 mM Calciumchlorid) eingesetzt oder Sephadex G100sf in Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, $I = 0,05$, 10 mM EDTA. Es wurden maximal 100 mg Protein in 1-5 ml Puffer aufgetragen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 4 ml/h, die Temperatur +4 Grad.

Die semipräparative Dünnschichtgelfiltration (TLG) wurde auf 20 x 40 cm großen Glasplatten in einer Apparatur der Firma Pharmacia nach der Bedienungsanleitung durchgeführt. Als Matrices dienten die Sephadexgele G150sf und G200sf bei einer Schichtdicke von 0,6 mm. Als Puffer wurde 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5, 10 mM Calciumchlorid) verwendet. Nach Äquilibrierung über 12 Stunden bei einer Neigung von 10 Grad und Raumtemperatur wurden auf 15 cm Breite drei Proteinproben (max. je 2 mg/ml) aufgebracht, jeweils getrennt durch Zwischenräume von 1 cm. Anschließend wurde ein Neigungswinkel von 15 Grad eingestellt. Nach 5-6 Stunden wurde von 2 Randstreifen und den beiden Zwischenräumen ein Abklatsch auf Whatman 3MM Filterpapier angefertigt. Die Replikas wurden mit

Coomassie BB G250 angefärbt (nach Gebrauchsanweisung) und wieder in das Hauptgel eingepaßt. Auf diese Weise konnten die Proteine lokalisiert und eluiert werden. Die Elution erfolgte in Filtervorsätzen der Firma LKB mit zweimal 0,5 ml Äquilibrationpuffer bei 4 Grad Celsius über Nacht.

8. IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE

Es wurde der Anionenaustauscher DEAE-Sepharose CL-6B auf einer Säule von 25 x 0,9 cm verwendet. Diese war mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer von pH 8,8 (1 mM EDTA) äquilibriert; z.T. wurde noch 1 M Harnstoff zugesetzt (Schneider et al., 1980). Es wurden bis zu 60 mg Protein aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Hilfe des automatischen Gradientenmischers "Ultrograd" der Firma LKB. Es wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0,1 - 0,6 M in Äquilibrationpuffer angelegt. Die Versuchsdauer betrug bis zu 96 Stunden bei Raumtemperatur und einer Durchflußrate von 4 ml/Stunde.

9. ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION

Zur Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten nach der "moving boundary"-Methode wurde eine analytische Ultrazentrifuge Modell E der Firma Beckman mit photoelektrischem Scanner und Multiplexer eingesetzt. Es wurden Doppelsektorzellen mit Charcoal-Mittelstücken verwendet. Die Extinktion wurde bei 280 nm gemessen; die Proteinkonzentration betrug 0,2 - 1,0 mg/ml, die Lauftemperatur 20 Grad. Die Umdrehungszahlen betrugen 30000 bis 44000 UpM. Die Berechnung der S-Werte erfolgte graphisch nach Elias (1969). Da mit Puffern niedriger Molarität und bei niedriger Proteinkonzentration gearbeitet wurde, unterblieb die Korrektur der S-Werte auf den Wert $S^{\circ}_{w,20}$ (Chervenka, 1973). Erfahrungsgemäß (Decker, 1981) liegen unkorrigierte S-Werte um ca. 10 % tiefer als nach einer Korrektur.

10. ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Frau Martha Bijlholt und Frau Trijntje Wichertjes im Labor von Prof. E. van Bruggen an der Universität Groningen (Holland) durchgeführt. Verwendet wurde ein JEM 100B Elektronenmikroskop der Firma Jeol bei ca. 60000-facher Primärvergrößerung. Die Proteine wurden nach Siezen und van Bruggen (1974) durch Tropfen oder Sprühen auf Kohlefilm aufgebracht (ein Kupfernetz von 4 mm Durchmesser diente als Träger des Kohlefilms) und anschließend wie bei Brenner und Horne (1959) beschrieben mit 1 % Uranylacetat kontrastiert ("negative staining").

Als Photomaterial dienten Eastman-Kodak "fine grain release" positiv Film 53002 und Kodak "electron image plates".

11. IMMUNOLOGISCHE METHODEN

11.1 Kaninchenimmunisierung und Gewinnung von Antiseren

Je 1 mg Antigen pro Polypeptidkette, gelöst in 0,5 ml Puffer wurde mit 0,5 ml Freund's Adjuvans emulgiert und den Kaninchen subkutan entlang des Rückens injiziert. Im Abstand von 2, 4 und 6 Wochen nach der ersten Injektion wurden Boosterinjektionen in Form von 1 ml Antigenlösung ohne Adjuvans verabreicht. 3 Tage nach der letzten Injektion wurde eine Blutprobe aus einer Ohrvene entnommen und im Ouchterlony-Diffusionsverfahren untersucht (siehe unten). Wurde auch bei 8-facher Verdünnung des Antiserums das Antigen (1 mg/ml; 20 Mikroliter) noch präzipitiert, so wurde das Kaninchen unter Narcoren-Betäubung über eine Ohrvene am Wasserstrahlvakuum ausgeblutet (Ausbeute ca. 70-100 ml Blut pro Kaninchen). Nach Absitzen des Blutkuchens über Nacht bei 4 Grad wurde das überstehende Serum zellfrei zentrifugiert und in 1 ml Portionen eingefroren (bei -25 Grad oder in flüssiger Luft).

11.2 Geldiffusion nach Ouchterlony (1958)

Zur Abschätzung des Antikörpertiters von Seren und IgG-Präparationen wurde die Geldiffusion eingesetzt. Auf Plastic Plates

(Gel Bond Film) aufgebrachte Gele aus 1 %-iger Agarose M, die in 0,12 M Natrium-Veronal/Veronal-Puffer, $I = 0,02$, pH 8,6 gelöst war dienten als Diffusionsmedium. Die Antiseren und Antigene wurden in ausgestanzten Löchern von 4 mm Durchmesser aufgetragen und diffundierten über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Gele 10 Min. unter Filterpapier gepresst, 10 Min. in 0,06 %-iger NaCl-Lösung gespült, 10 Min. gewässert, nach erneutem Pressen mit Heißluft getrocknet und schließlich mit Coomassie Brilliant Blue G 250 gefärbt (Färbemischung: 2.5 g Coomassie gelöst in 200 ml Methanol + 50 ml Eisessig ad 500 ml). Die Entfärbung erfolgte in destilliertem Wasser.

11.3 Immunelektrophorese nach Grabar und Williams (1953)

Mit Hilfe der Grabar-Williams Technik wurde die Reinheit von IgG-Präparationen überprüft. Gelzusammensetzung: Gelpuffer: 13,38 g Natriumveronal, 8,83 g Natriumacetat $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1,5 l, pH-Einstellung mit HCl auf pH 8.3; Gel: 2 % Agarose M im Gelpuffer. Als Träger für die Gele dienten Objektträger aus Glas oder Plastic Plates (Gel Bond Film). Die Elektrophoresen wurden in einer LKB 2117 Multiphor Apparatur bei maximal 12,5 mA / Gel durchgeführt; Laufzeit ca. 1 Stunde. Für die anschließende Diffusion wurde anti-Kaninchen IgG Antiserum von der Ziege verwendet. Die weitere Behandlung der Gele erfolgte wie unter 11.2 beschrieben.

11.4 Zweidimensionale Immunelektrophorese (Laurell, 1965)

Die zweidimensionale Immunelektrophoresen wurden nach Weeke (1973), Tandem-crossed und crossed-Line Immunelektrophoresen nach Kroll (1973a,b) durchgeführt. Gel- und Elektrodenpuffer: Veronalpuffer wie unter 11.2 beschrieben; Gel: 1 % Agarose M im Gelpuffer; Träger: Plastic Plates (Gel Bond Film). Die Elektrophoresen wurden in LKB 2117 Multiphor Apparaturen mit Whatman Nr.1 Papier-Pufferbrücken durchgeführt. In der ersten Dimension wanderten die Antigene bei 600 V ca. 45 Min., in der zweiten Dimension bei 300 V 12-18 Stunden. Der Antiserumgehalt des Gels für die zweite Dimension lag zwischen 50 und 1800 Mikrolitern und richtete sich nach der Reaktivität des Antiserums und der immuno-

logischen Distanz von Antigen und Antiserum. Zeitdauer und Materialbedarf konnten durch Verwendung von Gelen mit $1/4$ der Originalgröße stark eingeschränkt werden ("Minis", ca. $4,5 \times 5,0$ cm nach Kempter, 1983).

Anwendung der zweidimensionalen Immunelektrophorese zur immunologischen Verwandtschaftsanalyse von Antigenen (Grubb, 1972; Bock und Axelsen, 1972; Axelsen und Bock, 1973).

a) Reaktion der Identität

Verschmelzen zwei Präzipitate vollständig, so sind die betreffenden Antigene immunologisch identisch.

b) Reaktion der Nicht-Identität

Antigene, deren Präzipitate sich überschneiden, bezeichnet man als immunologisch nicht kreuzreagierend oder nicht identisch.

c) Reaktion der partiellen Identität

Antigene, die zumindest in einigen antigenen Determinanten übereinstimmen, werden als partiell identisch bezeichnet. Die molekularen Grundlagen hierfür liegen entweder in einer Modifikation der Determinanten und/oder in einer unterschiedlichen Zahl von Determinanten. Im Bild der zweidimensionalen Immunelektrophorese drückt sich dies auf verschiedene Weise aus:

Skizze 1:



Antigen B wird als immunologisch defizient zu Antigen A bezeichnet. A und B unterscheiden sich in erster Linie in der Anzahl der für Antikörper zugänglichen Determinanten. Diese Zahl ist offensichtlich bei A größer als bei B (Skizze 1).

Skizze 2:



Abschwächung der Präzipitinlinien im Überschneidungsbereich: A und B besitzen eine Anzahl gemeinsamer Determinanten; darüber hinaus sind auf beiden Antigenen zusätzliche, spezifische Antikörperbindungsstellen vorhanden (Skizze 2).

Skizze 3:



Verformung von Präzipitaten am Überschneidungspunkt: diese schwache Form der immunologischen Kreuzreaktion tritt bei größerer immunologischer Distanz zweier Antigene auf (Skizze 3).

11.5 Rocket Immunelektrophorese nach Weeke (1973)

Bei dieser Variante der zweidimensionalen Immunelektrophorese (siehe 11.4) entfällt der Lauf in der ersten Dimension. Stattdessen können bis zu 20 Parallelproben in ihrer Reaktivität mit einem bestimmten Antiserum qualitativ und semiquantitativ verglichen werden.

11.6 Fused-Rocket Immunelektrophorese nach Svendsen (1973)

Bei dieser Spezialform der Rocket Immunelektrophorese läßt man die Antigene vor dem Start der Elektrophorese in den Startlöchern gegeneinander diffundieren (ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur). Dadurch überlappen die Präzipitate, was Rückschlüsse auf die immunologische Verwandtschaft der aufgetragenen Antigene erlaubt.

11.7 Spot-Technik nach Elwing et al. (1977)

Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit und der Konzentration von Fab-Fragmenten wurde die Spot-Technik angewandt. Dazu wurde an eine mit Alkohol gereinigte Acrylglas-Petrischale Antigen in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in 0,8 %-iger NaCl-Lösung adsorbiert (60 Min./37 Grad). Überschüssiges Antigen wurde mit destilliertem Wasser abgespült. Fab-Proben in Form von 5 Mikroliter-Tropfen wurden aufgebracht und 60 Min. bei 37 Grad inkubiert. Anschließend wurde die behandelte Petrischale 30 Sekunden dem Abdampf eines 60 Grad heißen Wasserbades ausgesetzt und dann mit destilliertem Wasser abgespült. Nach abermaliger Wasserdampfexposition konnte anhand des Benetzungsgrades die Konzentration der gekoppelten Fab-Fragmente abgeschätzt werden.

11.8 Quantifizierung der Antigen-Fab- und der Antigen-IgG-Wechselwirkung nach Loft (1975)

Auf ein Plastic Plate (Gel Bond Film) von 9 x 10 cm wurde ein Agarose M Gel (vgl. 11.2) gegossen, enthaltend anti-X Antiserum. In einen Trog am kathodischen Ende des Gels wurde eine definierte Menge Antigen X gefüllt. Parallel dazu wurden auf der anodischen Seite des Trogs in ausgestanzte Löcher verschiedene Mengen anti-X Fab, bzw. anti-X IgG Lösung pipettiert. Während der anschließenden Elektrophorese bei 300 V (vgl. 11.4) wurde die Line des Trog-Antigens bei IgG-Löchern retardiert, bei Fab-Löchern unterbrochen, da von monovalenten Fab-Fragmenten besetzte Antigenmoleküle vom korrespondierenden Antiserum nicht mehr präzipitiert werden können. Eine einer definierten Antigenmenge äquivalente Fab-(IgG)-Konzentration lag vor, wenn die Präzipitatlinie gerade noch durchbrochen (retardiert) wurde.

11.9 Gewinnung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum

Die Isolierung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum erfolgte durch dreimaliges Aussalzen mit halbgesättigter Natriumsulfatlösung in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 8,0 und Raumtemperatur (Kekwick, 1940).

11.10 Isolierung der Hämocyanin-spezifischen Immunglobuline G durch Affinitätschromatographie

a) Herstellung der Kopplungsmatrix durch Bromcyan-Kopplung (March et al., 1974; Johnson und Garvey, 1977)

Biogel A5m wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und mit dem dreifachen Volumen einer 2 M Natriumcarbonat-Lösung versetzt. Pro ml Biogel A5m wurden 2 g BrCN, gelöst in Acetonitril, unter Rühren auf dem Eisbad langsam zugetropft (3 - 30 Min., je nach Ansatzgröße). Nach 12 Min. Rühren wurde abgefritten und das aktivierte Biogel mit je 5 - 10 Volumina 0,1 M Natriumbicarbonat-Puffer von pH 9,7, enthaltend 0,5 M NaCl, destilliertem Wasser und schließlich 0,1 M Natriumbicarbonat-Puffer, pH 9,7, ohne NaCl gewaschen. Eine Lösung von 2 mg zu koppelndes Protein / ml

Biogel in einem Gelvolumen 0,1 M Bicarbonat-Puffer, pH 9,7 wurde zugegeben, unter Rühren zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und über Nacht bei 4 Grad aufbewahrt. Nicht gebundenes Protein wurde durch Waschen der Gelmatrix mit je 20 Gelvolumina der folgenden Lösungen entfernt:

- 0,125 M Natriumborat-Saline, pH 8,8
- 0,1 M Natriumacetat-Lösung
- 2 M Harnstoff, enthaltend 0,5 M NaCl
- 0,1 M Natriumbicarbonat-Puffer, pH 9,7.

Die Bestimmung des nichtgebundenen Proteins erfolgte photometrisch aus der Borat-Lösung. Anschließend wurde die Gelmatrix in 20 x 0,9 cm Säulen gefüllt und äquilibriert mit 0,1 M phosphat gepufferter Saline von pH 7,4 (PBS) unter Zusatz von 1 % Natriumazid bei 4 Grad aufbewahrt. Vor dem ersten Gebrauch wurden die Säulen mit BSA-Lösung gespült, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

b) Affinitätschromatographie (Kempster, 1983)

An BrCN-aktiviertes Biogel A5m wurde wie oben beschrieben dissoziiertes Hämocyanin gebunden. Bei 4 Grad wurden ca. 5 ml anti-Hämocyanin Antiserum aus Kaninchen aufgetragen (Durchflußrate 2 ml/Stunde). Nach Elution der Hämoglobin-Front wurde mit PBS nachgewaschen, bis die Extinktion des Eluats bei 280 nm den Wert von 0,01 OD unterschritt. Die Desorption der Hämocyaninspezifischen IgG-Moleküle erfolgte bei entgegengesetztem Durchfluß (20 ml/Stunde) durch eine Reihe von pH-Sprüngen.

Appliziert wurden je:

- 15 ml 0,2 M Glycin/HCl-Puffer, pH 2,8
- 15 ml 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung
- 15 ml 0,2 M Glycin/HCl-Puffer, pH 2,2
- 15 ml 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung.

Die sauren Fraktionen wurden sofort nach der Elution mit 1 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung neutralisiert.

11.11 Gewinnung von Fab-Fragmenten durch Papainspaltung

Nach 11.9 oder 11.10 hergestellte IgG-Präparationen wurden bei 37 Grad in 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,6, enthaltend 1 mM Cystein und 2 mM EDTA mit 1 Gewichtsprozent Papain inkubiert (Porter, 1959). Nach 16 Stunden wurde die Reaktion durch Blockierung des Cysteins mit 4-Hydroxy-mercuri-benzoat gestoppt. Die Reaktionslösung wurde gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 mit 10 mM Calciumchlorid dialysiert und das Ergebnis der Spaltung in der SDS-PAGE (ohne Zusatz von β -Mercaptoäthanol) untersucht. Die Fähigkeit der Fab-Fragmente, Antigen zu binden wurde mit der Spot-Technik (11.7) oder nach Loft (1975) (11.8) überprüft. Der Fc-Anteil wurde nicht abgetrennt.

E R G E B N I S S E

A) CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN HÄMOCYANINE UND ISOLIERUNG DER UNTEREINHEITEN

Ein Überblick über die Zahl der immunologisch distinkten Komponenten, aus denen die einzelnen Hämocyane aufgebaut sind, findet sich in der Zusammenfassung (Tab.3, S.122; Abb.45, S.123).

1. Hämocyanin aus ASTACUS LEPTODACTYLUS (Abt. Astacura)

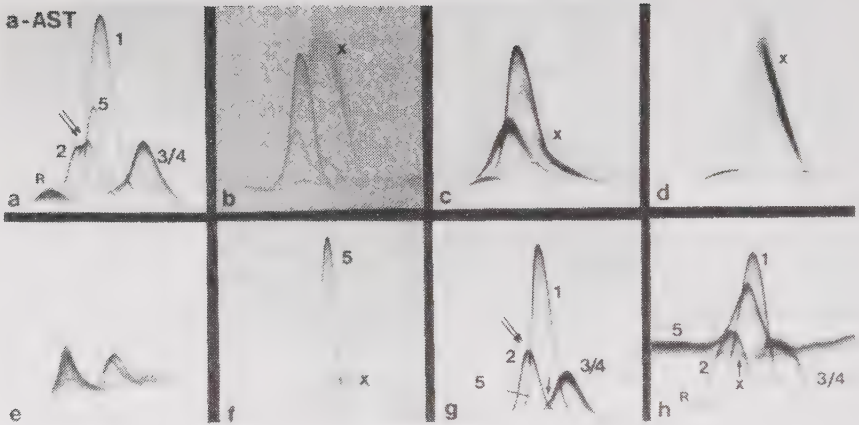
a) Bisherige Befunde

Das Hämocyanin aus dem europäischen Flußkrebs ASTACUS LEPTODACTYLUS liegt in der Hämolymphe als Dodekamer (2x6-Struktur; sedimentiert mit ca. 24S) und Hexamer (1x6-Struktur; sedimentiert mit ca. 16S) vor; der Hexameranteil kann vollständig fehlen (Markl et al., 1979b; Pilz et al., 1980). Gondko und Michalak (1981) berichten zudem von einer in geringen Mengen auftretenden 29S-Komponente. Hexamer und Dodekamer wurden von Markl et al. (1979b) isoliert und konnten in Bicarbonatpuffer von pH 10,1 quantitativ in Untereinheiten dissoziiert werden, wobei sich mittels Gelfiltration ein monomerer Anteil (5S; Mr 78000) von einem Dimer (7S; Mr 144000) abtrennen ließ. Elektrophoretisch konnte die Monomerfraktion in 4 Banden aufgetrennt werden, die als "1" bis "4" bezeichnet wurden. Das Dimer erhielt die Bezeichnung "5". Durch reduzierende Agenzien konnte ASTACUS 5 in zwei Monomere zerlegt werden, die elektrophoretisch in die Positionen der Untereinheiten 3 und 4 wanderten. Während das Dodekamer alle fünf Komponenten enthält, besteht das Hexamer lediglich aus den Untereinheiten 1 und 2 (Markl et al., 1979b). Immunologisch gesehen verhalten sich ASTACUS 1, 2 und 5 sehr unterschiedlich; zwischen 3,4 und dem Dimer besteht dagegen eine enge Verwandtschaft (Markl und Kempster, 1981a,b).

b) Isolierung der dimeren Untereinheit

In den Arbeiten von Markl et al. (1979b) sowie Markl und Kempster (1981a,b) wurden die monomeren Untereinheiten des Hämocyanins

aus ASTACUS durch präparative Disc-Elektrophorese erstmals einzeln isoliert. Der Reinheitsgrad und die Ausbeute waren jedoch noch unbefriedigend. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit mußten daher andere Isolierungsmethoden eingesetzt werden. Vor allem nahm ich Abstand von der Dissoziation des Hämocyanin-Pellets in Bicarbonatpuffer pH 10,1, da ich feststellte, daß dieses Verfahren mit einer deutlichen Abnahme der Hämocyaninspezifischen Absorption bei 340 nm verbunden ist. Letzteres führe ich auf eine teilweise Denaturierung des Proteins unter Kupferverlust zurück, da das Muster der zweidimensionalen Immunelektrophorese einen großen diffusen Peak über den Untereinheiten zeigte (Abb.1b); eine Dialyse des Untereinheitengemisches gegen 4 M Harnstoff wandelte die Untereinheitengipfel allmählich in dieses Präzipitat um (Abb.1c,d). Glycin/NaOH-Puffer von pH 9,6 mit 10 mM EDTA als Dissoziationsmedium erwies sich eindeutig als schonender. Dieser Puffer hatte allerdings den Nachteil, daß ca. 20% des Hämocyanins undissoziiert blieben (Abb.1a). Die Dissoziationsprodukte trennte ich nach Markl et al. (1979b) durch Gelfiltration auf (Abb.2a). Dabei wurden drei Fraktionen erhalten, die ich mittels PAGE als Oligomere (undissoziiert), Dimer, und Monomere identifizierte (Abb.2b). Der undissoziierte Anteil wurde in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Er enthielt neben einer 24S- und einer 16S- auch zwei 18S-Komponenten. Diese wanderten in der PAGE oberhalb des Hexamers (Abb.2b). Die Zahl der in diesen Komponenten enthaltenen Untereinheiten wurde später mit der Methode von Hedrick und Smith (1968) mittels PAGE zu 7 bestimmt (Abb.31); es handelt sich um Dissoziations-Zwischenstufen des 24S-Hämocyanins, die in Kapitel C genauer charakterisiert werden. Die drei Gipfel aus der Gelfiltration wurden anschließend gegen Dissoziationspuffer dialysiert und in der zweidimensionalen Immunelektrophorese untersucht (Abb.1e-g). Das Dimer 5 war rein bis auf einen diffusen Peak, der als denaturiertes Hämocyanin identifiziert wurde: Es war immunologisch identisch mit dem in 4 M Harnstoff denaturierten ASTACUS-Hämocyanin. Durch crossed-Line Immunelektrophorese wurde das Dimer im ASTACUS-Gesamtmuster identifiziert (Abb.1h).



Abbildungung 1:

Muster der zweidimensionalen Immunelektrophorese der Untereinheiten des Hämocyanins aus ASTACUS gegen anti-ASTACUS Antiserum. Die Anode der 1. Dim. war links.

(a) Gesamtmuster des dissoziierten 24S-Hc's. Dieses Material wurde in die Gelfiltration eingesetzt. R = undissoziiertes Hc. Der Doppelgipfel von Untereinheit 2 ist vermutlich auf eine Wechselwirkung mit dem Dimer 5 zurückzuführen (Doppelpfeil); fehlt letzteres, so zeigt sich ASTACUS 2 homogen (siehe g). (b) Gealtertes Gesamt-Dissoziat; X = denaturiertes Hc. (c, d) Gesamt-Dissoziat, 2 bzw. 24 Stunden gegen 4M Harnstoff dialysiert; X = denaturiertes Hc. (e-h) Fraktionen aus der Gelfiltration in Abb. 2a, in die das in (a) gezeigte Hc eingesetzt wurde. (e) 24S-, 18S- und 16S-Material; (f) 7S = Dimer; X = denaturiertes Protein; (g) 5S = Monomere; Doppelpfeil vgl. (a); Pfeil: schwache Wechselwirkung zwischen 2 und 3/4; beachte Rest an 5; (h) crossed-Line IE mit dem isolierten Dimer in der Line gegen Gesamt-Dissoziat. Beachte, daß die Line nicht nur mit dem Dimer, sondern auch mit den Monomeren 3/4 reagiert. Das durchgezogene Line-Material (X) geht auf das denaturierte Protein zurück.

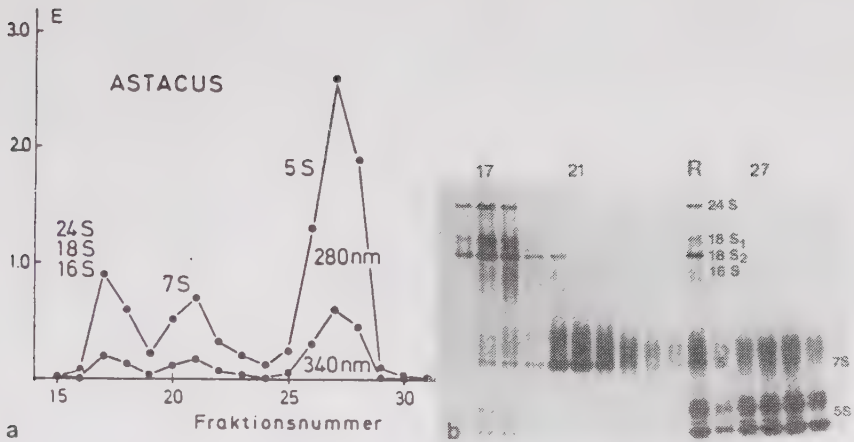


Abbildung 2:

Isolierung der dimeren 7S- und der monomeren 5S-Fraktion des dissoziierten 24S-Hämocyanins aus ASTACUS:

(a) Elutionsprofil der Gelfiltration über Sephadex G100sf. Die Gipfelfraktionen wurden in der analytischen Ultrazentrifuge charakterisiert. (b) Analytische, native PAGE ausgewählter Fraktionen, pH 8,8; R = Referenz (Gesamt-Dissoziat). Anode unten.

c) Isolierung der monomeren Untereinheiten

Der Monomerengipfel wurde durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B mit Hilfe eines Natriumchloridgradienten weiter aufgetrennt (Abb.3a). Das Elutionsprofil wies fünf Gipfel auf, die elektrophoretisch (Abb.3b,c) und immunologisch untersucht wurden (Abb.4a,b,d). Der erste Gipfel enthielt ein Gemisch aus ASTACUS 3 und 4. Als nächste Untereinheit wurde reine ASTACUS 1 eluiert. Der dritte Gipfel, ASTACUS 2, war mit Untereinheit 1 verunreinigt. Untereinheit 2 wurde bis zur Homogenität gereinigt, indem der Anteil an ASTACUS 1 mit Hilfe eines ASTACUS 1-spezifischen Antiserums (s.u.) ausgefällt wurde (Abb.4c). Bei dem vierten und fünften Gipfel handelte es sich um reassoziertes Material. Mit Hilfe der in Abb.4a-d gezeigten Fraktionen wurden die drei, im Muster der zweidimensionalen Immuoelektrophorese sichtbaren, monomeren Komponenten durch crossed-Line Experimente identifiziert (Abb.4e-h). Die Monomere 1 und 2 erwiesen sich entsprechend den Befunden von Markl und Kempster (1981a) als immunologisch distinkt voneinander (Abb.1b); schwache Kreuzreaktionen wurden zwischen ASTACUS 2 und den Untereinheiten 3,4 und 5 festgestellt (Abb.1a,g;4g), was auch schon früher beobachtet worden war (vgl. Abb. 1c bei Markl und Kempster, 1981a). ASTACUS 1 ist dagegen mit keiner anderen Untereinheit immunologisch verwandt. Die Monomere 3 und 4 stellten sich als homogenes Präzipitat dar (Abb.4d); sie sind somit immunologisch identisch, was bei früheren Untersuchungen (Markl und Kempster, 1981a) nicht klar herausgearbeitet worden war. Das Dimer, welches als Verunreinigung im Monomerenpeak vorhanden war ist immunologisch unvollständig (defizient) gegenüber 3/4 (Abb.1h). Dies leuchtet ein, wenn man bedenkt, daß die Dimerisierung Bindungsstellen für Antikörper unzugänglich macht. Markl (1980) fand ganz ähnliche Verhältnisse beim 24S-Hämocyanin aus der Spinne CUPIENNIUS. Wurde das isolierte Dimer gegen 5 mM Cystein dialysiert, so dissoziierte es und ging in der PAGE in eine elektrophoretisch schnellere Doppelbande über, die an identischen Positionen wie 3/4 wanderte. Dies wurde bereits von Markl et al. (1979b) beobachtet. Auf eine Auftrennung von 3 und 4 wurde auf Grund der immunologischen Identität verzichtet. Schneider und Mitarbeiter, die derzeit an der Aufklärung

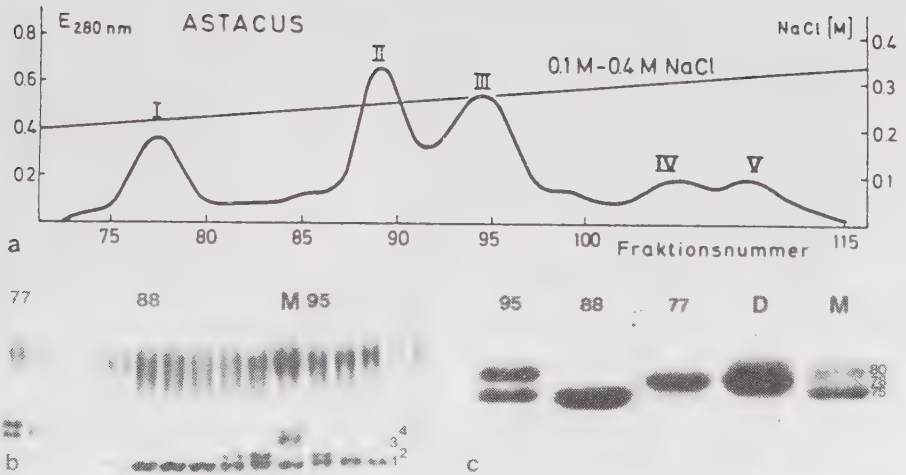


Abbildung 3:

Chromatographie der Untereinheiten des ASTACUS-Hämocyanins aus dem in Abb.1g gezeigten 5S-Gipfel:

(a) Elutionsprofil der Ionenaustausch-Chromatographie über DEAE-Sepharose CL-6B. (b,c) Analytische PAGE (pH 8,8) ausgewählter Fraktionen. Die Gipfelfraktionen 77, 88 und 95 sind gekennzeichnet. In beiden Fällen war die Anode unten.

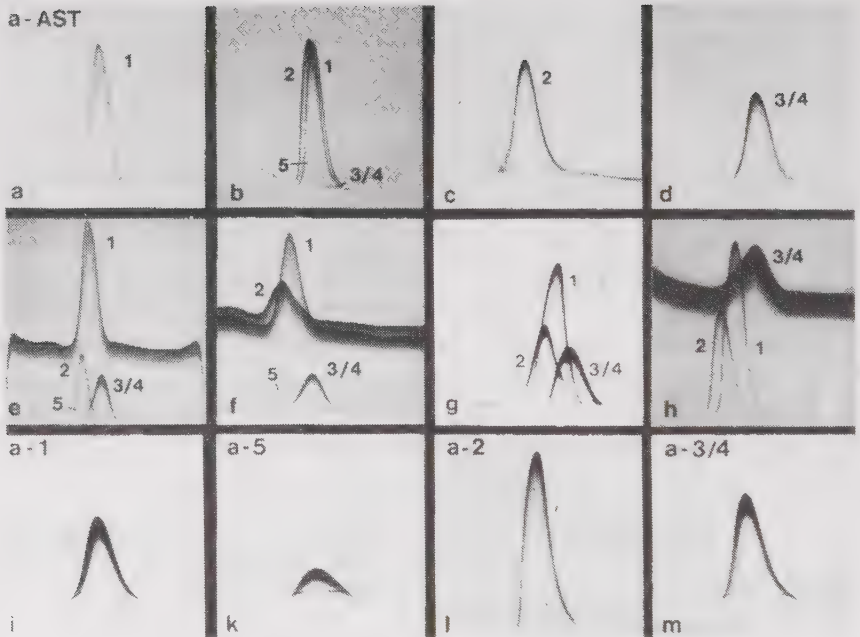


Abbildung 4:

(a-h) Muster zweidimensionaler Immunelektrophoresen der bei der Ionenaustausch-Chromatographie (Abb. 3) gewonnenen Hämocyanin-Untereinheiten von ASTACUS:

Die Anode war in der 1. Dim. stets links. In (a-h) wurde anti-ASTACUS Antiserum verwendet. (a-d) zeigt die gereinigten Untereinheiten. (b) Untereinheit 2 war stets begleitet von 1 sowie geringen Mengen 3/4, u.U. auch 5; (c) durch Ausfällung von 1, 3/4 und 5 mit den betreffenden Antiseren (i-m) gereinigte 2. (e-h) dieselben Untereinheiten in der Line gegen das Gemisch der Monomeren zur Identifizierung der Gipfel. 5 = Restanteil an Dimer; (i-m) gegen jede der isolierten Untereinheiten von ASTACUS-Hc wurde ein Antiserum hergestellt. Diese wurden durch Ausfällen mit den nicht-homologen Untereinheiten hochspezifisch gemacht. In (i-m) wurde das Gesamt-Dissoziat in die Versuche eingesetzt, aber jeweils nur eine Untereinheit präzipitiert, was die Spezifität der Antiseren demonstriert.

der Primärstruktur von ASTACUS 3/4 arbeiten, fanden tatsächlich weitestgehend homogene Verhältnisse der Aminosäuresequenz; an einigen Positionen traten jedoch zwei Aminosäuren gleichzeitig auf, was die in der PAGE sichtbare Doppelbande erklärt (persönliche Mitteilung). Insgesamt konnten alle immunologisch distinkten Untereinheiten des Hämocyanins aus ASTACUS rein dargestellt werden. Gegen jede wurde ein eigenes Antiserum hergestellt; Abb.4i-m dokumentiert die Spezifität dieser Seren.

d) Vergleich mit dem Hämocyanin aus CHERAX DESTRUCTOR

ASTACUS-Hämocyanin gleicht in seinem molekularen Aufbau dem Hämocyanin aus dem australischen Flußkrebs CHERAX DESTRUCTOR: Auch CHERAX besitzt vor allem dodekameres Hämocyanin, das sich aus den vier Untereinheiten M1, M2(1), M2(2) und M'3 zusammensetzt. M'3 ist ein S-S-verbrücktes Dimer, das im hexameren Hämocyanin aus CHERAX fehlt. Während M1 und M2 keine immunologischen Kreuzreaktionen zeigen, ist M'3 defizient gegenüber M1 (Murray und Jeffrey, 1974; Jeffrey et al., 1978, 1981). Somit entspricht M'3 sicher ASTACUS 5 und M1 eventuell ASTACUS 3/4. Das Monomer M1 stellt jedoch nicht die konstituierende Polypeptidkette des Dimers von CHERAX dar (Jeffrey et al., 1981). M2(1) und M2(2) entsprechen höchstwahrscheinlich ASTACUS 1 und 2, wobei eine nähere Zuordnung nur auf Grund der Literaturdaten nicht möglich ist. Neuere Publikationen über CHERAX-Hämocyanin (Jeffrey et al., 1981; Marlborough et al., 1981; Jeffrey und Treacy, 1982) berichten von einem weiteren Monomer M1(1) sowie einem zweiten Dimer M4; hierfür fand ich in ASTACUS keine eindeutige Entsprechung, jedoch zeigten verschiedentlich PAGE-Muster von dissoziiertem nativem Hämocyanin aus ASTACUS zusätzliche Banden (Abb.2b). Diese wurden von mir nicht näher charakterisiert, da sie sich nicht auch immunologisch distinkt ausdrückten. Eventuell handelt es sich um einen Polymorphismus; da meist die Hämolymphe mehrerer Tiere vereinigt wurde, muß diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden.

2. Hämocyanin aus HOMARUS AMERICANUS (Abt. Astacura)

a) Bisherige Befunde

Das Hämocyanin des nordamerikanischen Hummers HOMARUS AMERICANUS ist ein mit ca. 24S sedimentierendes Dodekamer (Lauffer und Swaby, 1955; Fernandez-Moran et al., 1966). Entzug von Calciumionen führt zum reversiblen Zerfall in hexamere (16S) Halbmoleküle (Pickett et al., 1966; Morimoto und Kegeles, 1971). Bei Erhöhung des pH-Werts über 9,3 dissoziieren die Hexamere weiter in mit 5S sedimentierende Monomere. Herskovits et al. (1983) stellten die polare Natur der Hexamer-Hexamer Interaktion fest. HOMARUS-Hämocyanin ist heterogen auf dem Niveau der Untereinheiten. Waxman (1975) fand zwei Proteinbanden in der SDS-PAGE mit Molekulargewichten um 77000. Markl et al. (1979b) wiesen elektrophoretisch 5 verschiedene Untereinheiten nach, die mehr oder weniger rein isoliert werden konnten. Außerdem wurde von denselben Autoren ein nichtrespiratorisches Hämolympheprotein gefunden, das ebenfalls mit 16S sedimentierte und dessen Polypeptidketten ähnliche Molekulargewichte wie die des Hämocyanins aufwiesen. Die Monomeren "1" bis "5" wurden von Markl und Kempfer (1981a) zwei in der zweidimensionalen Immunelektrophorese auftretenden Komponenten zugeordnet. Ein dritter, sehr diffuser Immunogipfel, der jedoch eindeutig aus dem 24S-Hämocyanin stammte, erwies sich als identisch mit einer mit 7S sedimentierenden dimeren Komponente. Allerdings stellte sich heraus, daß diese sogenannte Bande "6" vollständig kupferfrei war (Markl und Kempfer, 1981a).

b) Isolierung des 24S-Hämocyanins und Untersuchung des nichtrespiratorischen 16S-Proteins (NRP-1)

Hämocyanin repräsentiert bei HOMARUS 60-90% des gelösten Hämolympheproteins. Den Rest stellen u.a. Heteroagglutinine (unter 1%: Hall and Rowlands, 1974) sowie, mengenmäßig bei weitem dominierend (10-40%), das von Markl et al. (1979b) beschriebene nichtrespiratorische 16S-Protein (NRP-1). Das 24S-Hämocyanin ließ sich vom 16S-NRP-1 durch Gelfiltration abtrennen (Abb.5a). Das NRP-1 wanderte elektrophoretisch etwas oberhalb des hexameren Hämocyanin-Halbmoleküls (Abb.5d) und zerfiel bei Behandlung mit

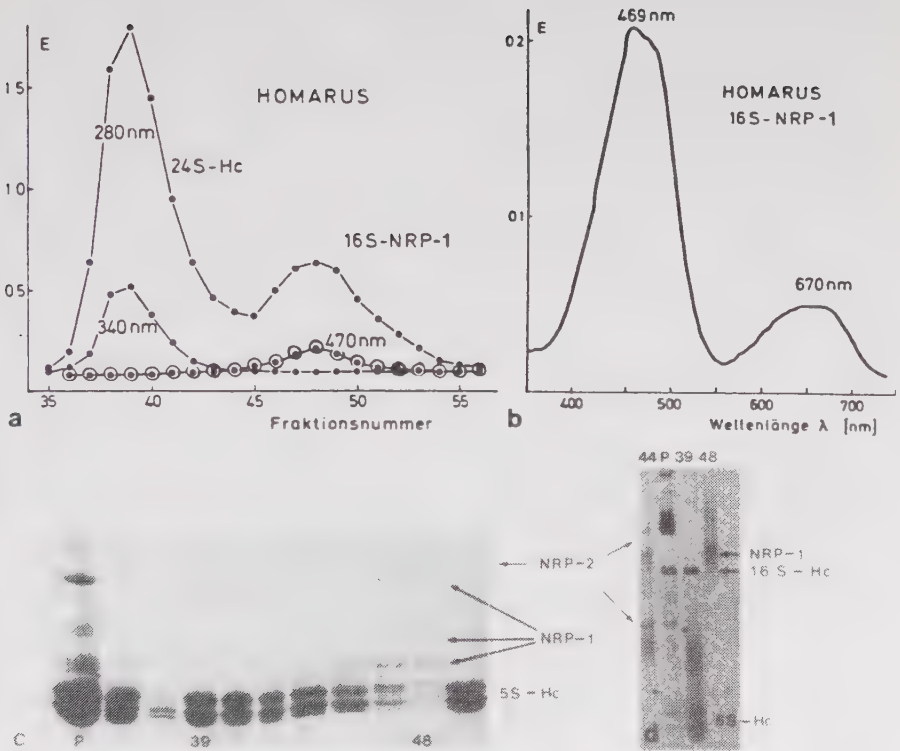


Abbildung 5:

Trennung des 24S-Hämocyanins aus HOMARUS vom nichtrespiratorischen 16S-Protein (NRP-1):

(a) Elutionsprofil der Gelfiltration über Biogel A5m. Von den Gipfelfraktionen wurden die S-Werte bestimmt.

(b) Absorptionsspektrum des 16S-NRP-1. (c,d) Analytische PAGE ausgewählter Fraktionen der Gelfiltration; Anode unten; pH 8,8. Die Gipfelfraktionen sind gekennzeichnet; P = Pellet der präparativen Ultrazentrifugation, das aufgetrennt wurde; (c) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol; Gelkonzentration 7,5%; das NRP-2 wurde bei der Gelfiltration nicht vollständig vom 24S-Hc abgetrennt; (d) native PAGE; Gelkonzentration 5-10%; in Fr.44 war hauptsächlich NRP-2 enthalten.

SDS in Polypeptidketten mit Molekülmassen von ca. 90000 (Abb.5c). Es ist rot gefärbt und besitzt Absorptionsmaxima bei 469 und 670 nm (Abb.5b). Mit Äther ließ sich der rote Farbstoff ausschütteln. Dies deutet auf ein Carotenoproteid hin, wie es auch von Manwell (1960) bei diversen Crustaceen gefunden wurde. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei dem Farbstoff um das von Goodwin (1960) beschriebene β -Carotinderivat Astaxanthin. Bei einigen Isolierungen wurden nach der Gelfiltration in der PAGE (Abb.5c,d Fr.44) neben 16S-Hämocyanin schwerere Komponenten erkennbar, bei denen es sich um weitere NRP's handeln dürfte, die sich unter den gewählten Bedingungen nicht vollständig vom 24S-Hämocyanin trennen ließen (Abb.5c). Die Identität des in Abb.5d als NRP-2 bezeichneten Proteins mit der schwersten SDS-Bande (Abb.5c) ist wahrscheinlich, ebenso der Zerfall des NRP-2 in eine unterhalb von 16S-Hämocyanin wandernde Bande. Das NRP-2 konnte erst bei der Gelfiltration des dissoziierten 24S-Gipfels entfernt werden (siehe unten, Abb.6).

c) Dissoziations- und Denaturierungsprobleme beim 24S-Hämocyanin

In der analytischen Ultrazentrifuge zeigte sich das native Hämocyanin aus HOMARUS quantitativ als 24S-Aggregat. Die 24S-Einheit ließ sich jedoch in der PAGE bei pH 8,8 nicht nachweisen, sondern zerfiel vollständig in Hexamere und diese teilweise weiter in Untereinheiten (Abb.5d, Fr.39). Versuche, das 24S-Molekül durch Zugabe von Calciumionen zum Gel- und Elektrodenpuffer zu stabilisieren, schlugen fehl. Im PAGE-System Nr.6 nach Maurer (1968) bei pH 7,5 blieb das Dodekamer zwar stabil, jedoch ist dieses System zur klaren Darstellung der Untereinheiten nicht geeignet. Außerdem laufen hier unkontrollierbare Reassoziationsprozesse ab. Somit ergibt sich, daß insbesondere bei HOMARUS die PAGE ein ungünstiges Verfahren ist, den Aggregationszustand des Hämocyanins zu beurteilen. Dies war bei den anderen von mir untersuchten Hämocyaninen besser möglich:

Die Bestimmung des Kupfergehalts des isolierten 24S-Hämocyanins mittels Atomabsorptionsspektroskopie ergab den von Pickett et al. (1966) publizierten Wert von 0,175 Gewichtsprozent, der einem Molekulargewicht der monomeren Untereinheit von ca. 75000 entspricht. Wurde die Probe gegen Glycin/NaOH-Puffer von pH 9,6

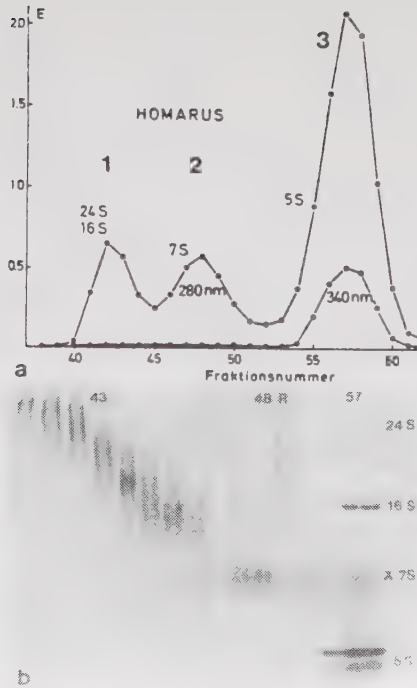


Abbildung 6:

Isolierung der 5S-Fraktion aus dem Dissoziationsgemisch von HOMARUS 24S-Hämocyanin:

(a) Elutionsprofil der Gelfiltration über Sephadex G100sf mit den S-Werten der Gipfelfraktionen. (b) Analytische PAGE ohne SDS (nativ), pH 8,8, Anode unten, 5-10%-Gel; die Gipfelfraktionen sind gekennzeichnet; R = bei der Gelfiltration aufgetragenes Material; X = denaturiertes Protein über den Hc-Monomeren, das erst nach der Gelfiltration dimerisiert sein kann.

dialysiert, so gingen im Verlauf von 48 Stunden über 40% des Kupfers verloren. Die Gelfiltration des Dissoziates ergab drei Gipfel (1-3), die elektrophoretisch und mit der analytischen Ultrazentrifuge als Monomere, Dimer und 16S/24S-Aggregate identifiziert wurden (Abb.6). Ein Teil der Monomeren war bei der Elektrophorese zu Hexameren reassoziert (Abb.6). Es zeigte sich, daß die Monomere noch 72% des theoretischen Kupfergehalts besaßen, während dieser in den anderen beiden Fraktionen drastisch reduziert war, was sich auch in der verminderten Absorption bei 340 nm widerspiegelte (Abb.6a). Im Gegensatz zu den Monomeren (Gipfel 3) waren die PAGE-Banden der beiden anderen Gipfel verschmiert und unscharf, was ein Zeichen für Denaturierung ist. In Gipfel 3 zeigte sich oberhalb der klaren Monomerbanden eine verschwommene Dimerkomponente, die erst nach der Gelfiltration aus dem Proteinmaterial von Gipfel 3 entstanden sein kann (Abb.6b). Die scharfe 16S-Bande in der selben Probe (Abb.6b, Fr.57) geht auf reassoziertes intaktes Hämocyanin zurück, das durch die Bedingungen bei der Elektrophorese (Konzentrierungseffekt) entstanden sein dürfte. Ich habe versucht, die allmähliche Denaturierung des Hämocyanins aus HOMARUS durch zeitabhängige Inkubation von frischem 24S-Material in 4 M Harnstoff zu verfolgen. Nach 24 Stunden Dialyse betrug der Kupferverlust nahezu 100%. In der zweidimensionalen Immunelektrophorese zeigte sich, daß die beiden Untereinheiten 1 bis 5 entsprechenden Gipfel zunehmend in den diffusen dritten Peak übergingen (Abb.7a-d), also in die dimere Bande 6 von Markl und Kempfer (1981a). Entsprechend war dieser diffuse Peak immunologisch identisch mit dem in der vorliegenden Arbeit durch Gelfiltration isolierten Dimer (Abb.7e,f). Damit war es zunächst äußerst wahrscheinlich, daß es sich bei Bande 6 um ein denaturiertes und dabei dimerisiertes Produkt der Banden 1 bis 5 handelte.

d) Die Zahl der Untereinheiten im Hämocyanin aus HOMARUS

Bei der Suche nach schonenderen Dissoziationsbedingungen ergab sich, daß bei Dialyse gegen 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,8, 1 mM EDTA (dem Puffer für die nachfolgende Ionenaustauschchromatographie) das HOMARUS-Hämocyanin quantitativ in 5S-Partikel zerfiel, ohne daß sichtbare Denaturierungseffekte auftraten. Die

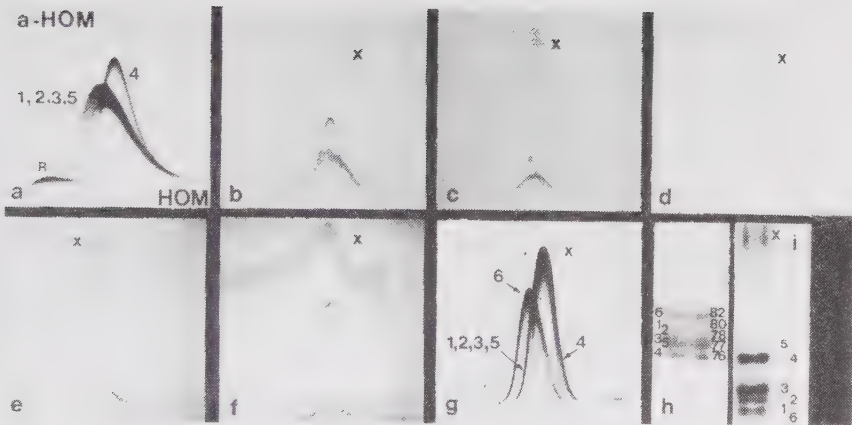


Abbildung 7:

(a-g) Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit dissoziiertem HOMARUS-Hämocyanin:

In der 1. Dim. war die Anode links. (a-f) Anti-HOMARUS 1-5 Antiserum (dieses Antiserum erkennt die Untereinheit 6 nicht); (g) anti-HOMARUS Antiserum. (a-e) Hc-Dissoziat nach 0, 2, 6 und 24 Stunden Dialyse gegen 4M Harnstoff-haltigen Dissoziationspuffer; R = undissoziiertes Hc; X = denaturiertes Protein. (f) crossed-Line IE mit Material wie in (e) und der 7S-Fraktion aus der Gelfiltration in der Line (vgl. Abb. 6a,b). (g) Hc-Dissoziat gegen anti-HOMARUS Antiserum; beachte das neue Präzipitat "6". (h,i) Analytische PAGE bei pH 8,8 mit dissoziiertem HOMARUS-Hc; in beiden Fällen war die Anode unten. (h) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol; 7,5% Gel; rechts die Molekulargewichte der Banden 1-6 x 1/1000. (i) Native PAGE; 5-10% Gel; X = diffuse Bande im 7S Bereich.

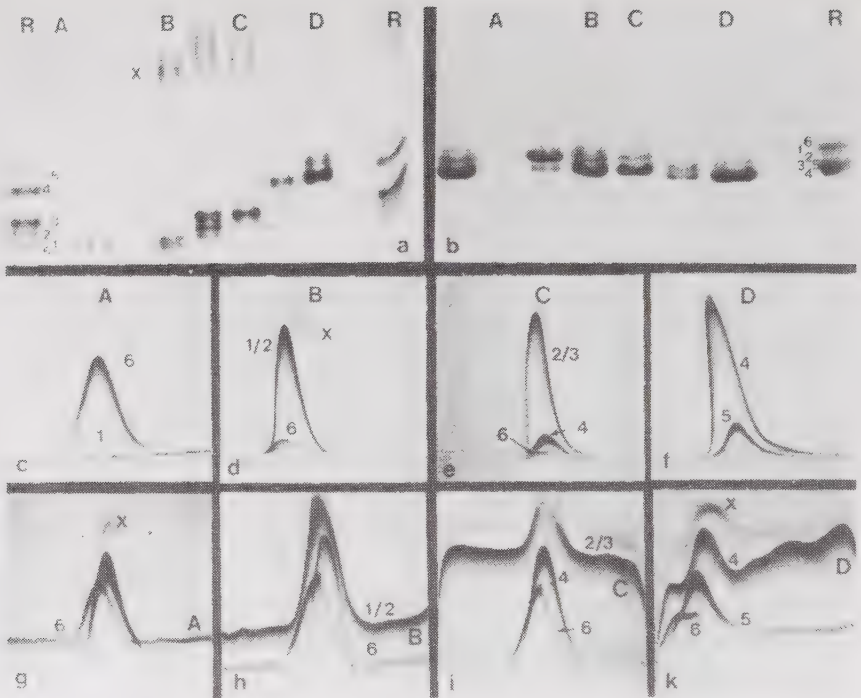


Abbildung 8:

Isolierung der Untereinheiten von HOMARUS 24S-Hämocyanin durch mikropräparative PAGE:

(a,b) Analytische PAGE der isolierten Fraktionen A-D bei pH 8,8; Anode unten; R = HOMARUS-Hc Dissoziat. (a) Native PAGE; 5-10% Gel; X = diffuse 7S-Fraktion; (b) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol; 7,5% Gel. (c-k) Zweidimensionale IE's gegen anti-HOMARUS Antiserum; in der 1. Dim. war die Anode links; X = denaturiertes Protein. (c-f) Zweidimensionale IE's der isolierten Fraktionen A-D. (g-k) Crossed-Line IE's mit HOMARUS-Hc Dissoziat; in der Line befanden sich die Fraktionen A-D.

zweidimensionale Immunelektrophorese ließ den diffusen dritten Gipfel fast vollständig vermissen und brachte darüberhinaus ein unerwartetes Ergebnis: eine bis dahin noch nicht gefundene weitere "echte" Untereinheit (Abb.7g). Diese Bande wurde nach ihrer Isolierung (s.u.) auch in der alkalischen PAGE untersucht und wandert dort unterhalb von Bande 1 (Abb.7i). Durch das UV-Spektrum wies sich die neue Untereinheit als Hämocyanin aus. Sie ist identisch mit der bereits von Markl et al. (1979b) beschriebenen Polypeptidkette vom Molekulargewicht 81000 (ich bestimmte ein Mr von 82000; Abb.7h), die damals als Monomer eines hypothetischen 24S-NRP's aufgefaßt worden war und die später von Markl und Kempster (1981a) dem kupferfreien Dimer zugeordnet wurde. Offensichtlich denaturiert die neu entdeckte Untereinheit besonders leicht und stellte bisher den Hauptanteil des sog."kupferfreien Dimers". Sie wird deshalb im folgenden, ebenso wie früher dieses "Dimer", als HOMARUS 6 bezeichnet.

Die Untereinheiten 1 bis 6 wurden durch Herausschneiden aus Polyacrylamidgelen im mikropräparativen Maßstab isoliert und auf diese Weise relativ rein gewonnen. Die Fraktionen A-D in Abb.8a-f entsprechen den herausgeschnittenen Gelbanden. Dadurch konnten die Muster der nativen PAGE, der SDS-PAGE und der zweidimensionalen Immunelektrophorese einander zugeordnet werden (Abb.8). Im wesentlichen wurden die Ergebnisse von Markl et al. (1979b) sowie Markl und Kempster (1981a) bestätigt, wobei ich eine erheblich bessere Auftrennung in der SDS-PAGE erzielte. Neu ist der Befund, daß Bande 2 immunologisch nicht mit HOMARUS 4, sondern mit HOMARUS 1/3/5 identisch ist. Homarus 4 und das neue Monomer 6 zeigten weder untereinander noch mit 1/2/3/5 immunologische Kreuzreaktionen.

e) Isolierung der Untereinheiten im präparativen Maßstab

Die in den früheren Arbeiten verwendete präparative Disc-Elektrophorese hatte auch beim Hämocyanin aus HOMARUS nicht zur Reindarstellung aller Untereinheiten geführt. Ich verwendete daher auch hier die Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose CL-6B, ausgehend von bei pH 8,8 dissoziiertem 24S-Material. Insgesamt wurden 5 Gipfel (I-V) eluiert (Abb.9a). Die Zusammensetzung der Fraktionen wurde elektrophoretisch und immunologisch untersucht

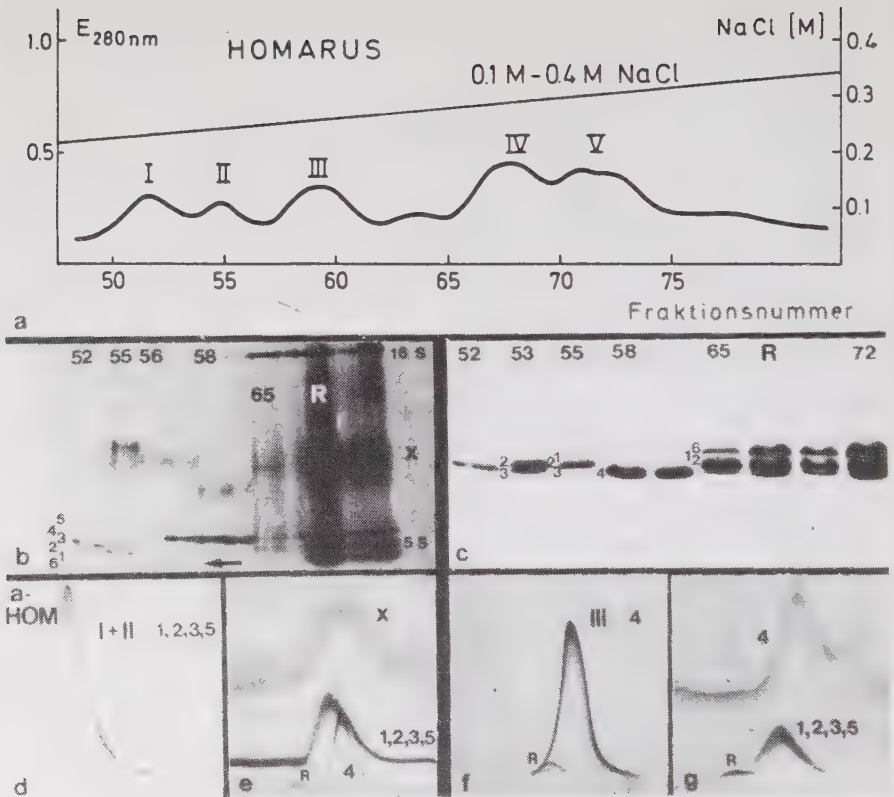


Abbildung 9:

Isolierung der Untereinheiten von HOMARUS-Hämocyanin aus der 5S-Fraktion der Gelfiltration über Sephadex G100sf.: (a) Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose CL-6B. (b,c) Analytische PAGE bei pH 8,8 mit Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie; Anode unten; R = Gesamtdissoziat. (b) Native PAGE; 5-10% Gel; X = denaturiertes Hc; Pfeil: Untereinheit 6; (c) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol, 7,5% Gel. (d-g) Zweidimensionale IE's gegen anti-HOMARUS 1-5 Antiserum (Untereinheit 6 wird von diesem Antiserum nicht präzipitiert!); die Anode der 1. Dim. war links. (d) Fraktionen der Elutionsgipfel I und II; (f) Fr. 58 aus Gipfel III; R = reassozierte HOMARUS 4. (e,g) Crossed-Line IE's mit HOMARUS-Hc Dissoziat; R = undissoziiertes Material; (e) in der Line war Material aus Gipfel I und II; X = denaturiertes Protein; (g) Fr. 58 aus Gipfel III in der Line.

(Abb.9b-f). Die Gipfel I und II enthielten ausschließlich die immunologisch identischen Komponenten 1, 2, 3 und 5 in unterschiedlicher Verteilung, während in Gipfel III die reine Untereinheit 4 vorhanden war. Die Gipfel IV und V enthielten reassoziertes 16S-Material, in das fast der gesamte Anteil an Untereinheit 6 eingebaut war, so daß letztere mit dieser Methode nicht isoliert werden konnte. Spuren von Untereinheit 6 wurden zwischen Gipfel II und III eluiert (Pfeil in Abb.9b).

Zur Reindarstellung von HOMARUS 6 isolierte ich aus den spezifischen Antiseren gegen die beiden anderen Komponenten (s.u.) die Fraktion der Immunglobuline und benützte diese zum Ausfällen der homologen Antigene aus dem Gesamtgemisch der drei Untereinheitentypen. Auf diese Weise erhielt ich reine HOMARUS 6. Bei den meisten der später beschriebenen Experimente störte nicht, daß die isolierte HOMARUS 6 mit dem nicht Hämocyanin-spezifischen IgG-Anteil kontaminiert war. Für Reassoziationsexperimente war dies ungünstig; hier wurde Bande 6-Material eingesetzt, das durch mehrere mikropräparative Gelelektrophoresen gewonnen worden war (Abb.10f).

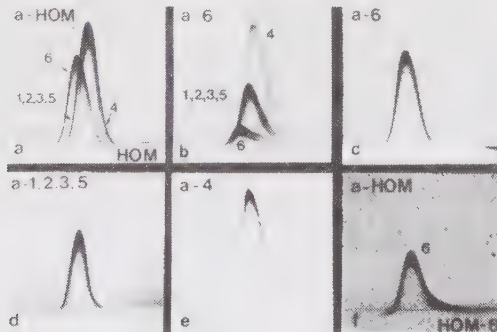


Abbildung 10:
Herstellung spezifischer Antiseren gegen die HOMARUS-Hämocyanin Untereinheiten und Reinigung von HOMARUS 6:
(a-f) Zweidimensionale IE's; die Anode der 1.Dim. war links. In (a-e) wurde HOMARUS-Hc Dissoziat in der 1.Dim. aufgetrennt. (a) HOMARUS-Hc Dissoziat gegen anti-HOMARUS Antiserum; (b,c) Ausfällung der Spezifitäten gegen HOMARUS 1-5 aus dem anti-HOMARUS Antiserum zur Erzeugung HOMARUS 6-spezifischen Antiserums; (b) teilweise Ausfällung durch Inkubation des anti-HOMARUS Antiserums mit den Untereinheiten 1-5; (c) spezifisches anti-HOMARUS 6 Antiserum. (d) anti-HOMARUS 1/2/3/5 Antiserum; (e) anti-HOMARUS 4 Antiserum; (c,d,e) demonstrieren die Spezifität der gereinigten Antiseren. (f) Durch mikropräparative PAGE isolierte HOMARUS 6 gegen anti-HOMARUS Antiserum.

Die bei dieser Methode anfallenden Verunreinigungen durch feinverteiltes Gelmaterial konnten über eine 2 cm lange Ionenaustauschersäule (DEAE-Sephrose CL-6B in einer Pasteurpipette) entfernt werden, was die vereinigten Proben gleichzeitig konzentrierte.

Gegen HOMARUS 1/2/3/5 und HOMARUS 4 stellte ich spezifische Antisera her (Abb.10d,e). Ein anti-HOMARUS 6-Antiserum erzeugte ich durch Ausfällen der Spezifitäten gegen HOMARUS 1/2/3/5 und 4 aus einem anti-HOMARUS Gesamt-Antiserum (Abb.10a-c).

HOMARUS 24S-Hämocyanin enthält also sechs elektrophoretisch unterscheidbare Untereinheiten (1-6), denen fünf Banden in der nach Masse trennenden SDS-PAGE entsprechen. Immunologisch lassen sich drei Typen von Untereinheiten unterscheiden, die miteinander nicht kreuzreagieren: HOMARUS 1/2/3/5, HOMARUS 4 und HOMARUS 6.

3. Hämocyanin aus den Krabben *CANCER PAGURUS* und *OCYPODE QUADRATA* (Abt. Brachyura)

a) Bisherige Befunde

Die Hämolymphe des europäischen Taschenkrebsses *CANCER PAGURUS* enthält hauptsächlich ein 24S-Hämocyanin (Eriksson-Quensel und Svedberg, 1936). In geringen Mengen kann daneben noch ein 16S-Hämocyanin vorliegen; bei Lagerung der Hämolymphe steigt der 16S-Anteil durch Zerfall des Dodekamers allmählich an. Außerdem enthält die Hämolymphe noch ein ebenfalls mit 16S sedimentierendes nichtrespiratorisches Protein (Markl et al., 1979b). Eriksson-Quensel und Svedberg (1936) beobachteten außerdem geringe Mengen einer 33S-Komponente. Elektrophoretisch trennten Markl et al. (1979b) das 24S-Hämocyanin nach Dissoziation in vier Banden auf, die die Bezeichnungen "1" bis "4" erhielten; im nativen 16S-Hämocyanin fehlte die Bande 3. Schon früher hatten Loehr und Mason (1973) bei der verwandten Art *CANCER MAGISTER* zwei verschiedene Polypeptidketten gefunden. Rochu und Fine (1980) beobachteten beim Hämocyanin aus *CANCER PAGURUS* drei distinkte Monomere. Schließlich untersuchten Markl und Kempster (1981a) die vier Untereinheiten in angereicherter Form immunologisch. Es stellte sich heraus, daß *CANCER* 2 und 3 immunologisch identisch

sind und CANCER 1 sich immunologisch defizient gegenüber beiden verhält. CANCER 4 kreuzreagiert dagegen nicht mit den anderen drei Untereinheiten.

Die Geisterkrabbe OCYPODE QUADRATA enthält ebenfalls 24S- und 16S-Hämocyanin, letzteres jedoch zu einem ungewöhnlich großen Anteil von 57% (Johnson, 1984). Bisher wurde über dieses Hämocyanin vornehmlich physiologisch gearbeitet (Redmond, 1968; Klarman und Daniel, 1977; Burnett, 1979). Die Untereinheitenzusammensetzung untersuchte Johnson (1984) elektrophoretisch, wobei auffiel, daß die Monomere 3 und 4 im nativen Hexamer fehlten und somit eventuell die Brückenfunktion beim Aufbau des Dodekamers übernehmen könnten.

b) Isolierung und Zuordnung der Untereinheiten von CANCER-Hämocyanin

Zunächst isolierte ich CANCER 24S-Hämocyanin aus der Hämolymphe durch Gelfiltration nach Markl et al. (1979b). Eine anschließende Verdünnung auf 3-6 mg/ml, gefolgt von einer Dialyse über 48 Stunden bei 4 Grad gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, führte zur quantitativen Dissoziation in Untereinheiten, was ich in der analytischen Ultrazentrifuge überprüfte. Aus dem Dissoziat versuchte ich mit Hilfe der präparativen Disc-Elektrophorese einzelne Untereinheiten zu isolieren (Abb.11). Ähnlich wie

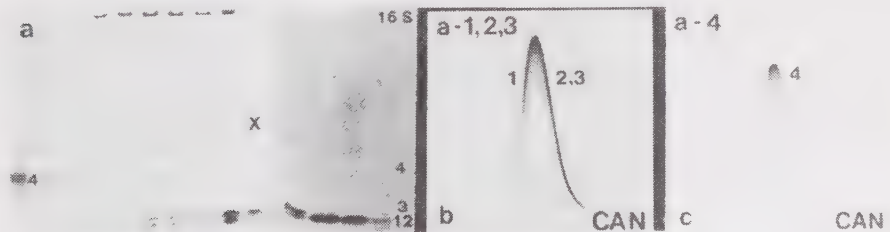


Abbildung 11:

Isolierung der Untereinheiten aus CANCER-Hämocyanin durch präparative PAGE: (a) Native PAGE mit Fraktionen der präparativen PAGE; Anode unten; am oberen Gelrand: reassoziiertes 16S-Hc; unten: Untereinheiten 1-4; die Reihenfolge bei der Elution war von rechts nach links: Untereinheit 1/2, 3 und zuletzt 4. Die Untereinheiten 1 und 2 erscheinen als eine homogene Bande; X = denaturiertes Hc. (b,c) Zweidimensionale IE's mit CANCER-Hc Dissoziat; die Anode der 1. Dim. war links. (b) anti-CANCER 1-3 Antiserum; Untereinheit 1 ist immunologisch defizient zu 2/3; (c) anti-CANCER 4 Antiserum.

bereits bei Markl et al. (1979b) sowie Markl und Kempter (1981a) gelang dies jedoch nur unvollständig: Bande 4 konnte zwar rein isoliert werden, Bande 3 war jedoch stets mit 1 und 2 verunreinigt, die ihrerseits nur als Gemisch isoliert werden konnten (Abb.11a). Ein weiterer Nachteil dieser Methode war, daß ein Großteil des Proteins während der Konzentrierungsphase wieder reassozierte und somit verloren ging. Ich konnte jedoch auf diese Weise beide immunologisch verschiedenen Typen von Untereinheiten nämlich CANCER 1-3 und CANCER 4 in reiner Form isolieren und jeweils ein spezifisches Antiserum herstellen (Abb.11b,c).

Als günstigere Alternative zur Isolierung der Untereinheiten erwies sich wiederum die Ionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule. Nach der Dissoziation bei pH 9,6 wurde das Protein im Dissoziationspuffer aufgetragen und die Säule anschließend mit dem Äquilibrierungspuffer von pH 8,8 bis zur pH-Konstanz gespült. Der angelegte lineare NaCl-Gradient von 0,1 - 0,6 M ergab ein Elutionsprofil mit 5 Gipfeln, die ich anschließend elektrophoretisch und immunologisch untersuchte (Abb.12). Die Gipfel I und II enthielten beide CANCER 4, und zwar in der monomeren (I) und in einer hexameren (II) Form. Gipfel III setzte sich aus einem Gemisch von Bande 1 und 2 zusammen; die bei manchen Präparationen auftretende Verunreinigung durch Untereinheit 4 (Abb.12b,c, Fr.35 und Abb.12e) wurde jeweils mit anti-CANCER 4 Antiserum ausgefällt (nicht abgebildet). Gipfel IV enthielt 1 und 2 in reassoziierter Form. Gipfel V schließlich bestand aus reiner CANCER 3. In der alkalischen PAGE stellte sich Komponente 3 als ein Gemisch aus Monomer und Dimer dar (Abb.12b, Fr.44). In der SDS-PAGE ergab sich dagegen nur eine homogene Monomerbande (Abb.12c, Fr.44). Die Fähigkeit zur Dimerisierung wurde bei keiner anderen CANCER-Untereinheit beobachtet. Bei dem Dimer handelt es sich nicht um das Produkt eines Denaturierungsprozesses, da es sich immunologisch nicht vom Monomer unterschied. Die Dimerisierung von CANCER 3 ist bemerkenswert im Hinblick auf die Beobachtung von Markl et al. (1979b), daß 3 im nativen Hexamer fehlt.

Mit Hilfe der isolierten Untereinheiten konnte ich das immunologische, das elektrophoretische und das SDS-elektrophoretische Bandenmuster der Untereinheiten miteinander korrelieren (Abb.12). Dabei ergab sich gegenüber Markl et al. (1979b) teilweise eine

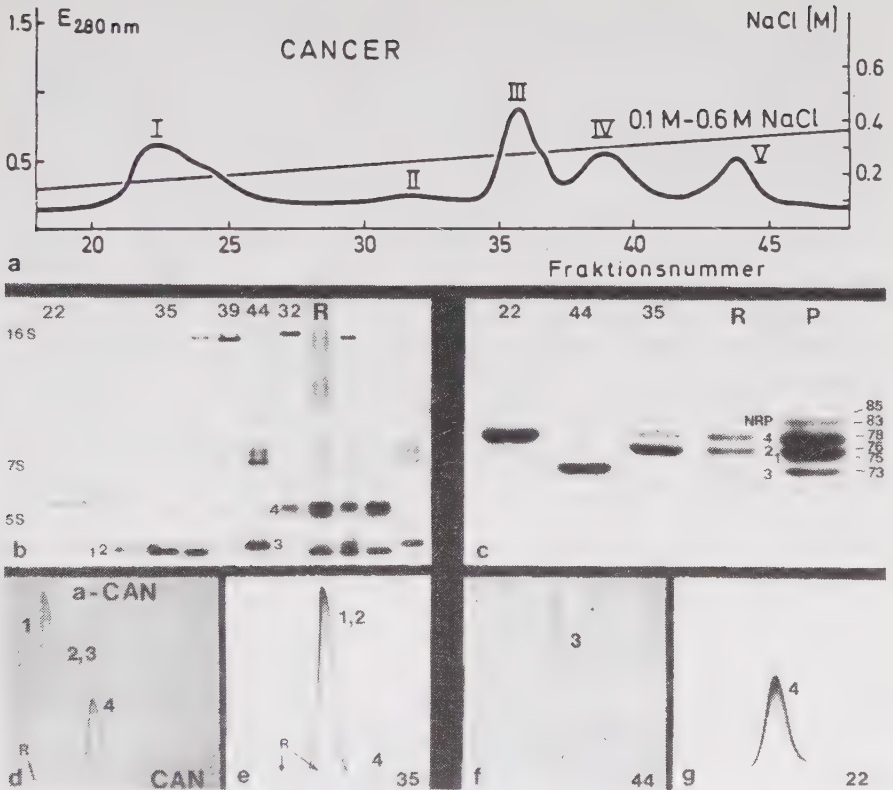


Abbildung 12:

Isolierung der Untereinheiten von CANCER-Hämocyanin:

(a) Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie des dissoziierten CANCER Hc's über DEAE-Sepharose CL-6B bei pH 8,8. (b,c) Analytische PAGE bei pH 8,8 der Gipfelfrak-tionen aus (a); Anode unten; R = dissoziiertes CANCER 24S-Hc (Material, das auf den Austauscher aufgetragen wurde). (b) Native PAGE; 5-10% Gel: die Untereinheit 4 wurde als Monomer (Gipfel I, Fr.22) und als reassoziertes Hexamer (Gipfel II, Fr.32) erhalten; gleiches gilt für Untereinheit 1/2: monomer in Gipfel III (Fr.35) und hexamer in Gipfel IV (Fr.39); Untereinheit 3 war teilweise dimerisiert (Gipfel V, Fr.44). (c) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol, 7,5% Gel; P = Pellet aus CANCER-Hämolymph nach präparativer Ultrazentrifugation: die kathodische Doppelbande (besser aufgelöst in Abb.14c) entspricht dem NRP und fehlt im 24S-Hc (R). Die Molekulargewichte der Monomere ($\times 1/1000$) sind bei P aufgetragen. (d-g) Zweidimensionale IE's der isolierten Fraktionen gegen anti-CANCER Antiserum, die Anode der 1.Dim. war links; R = reassoziertes bzw. undissoziiertes Material; (d) dissoziiertes CANCER-Hc (UE 1 ist nur schwach zu erkennen); (e) Fr.35; (f) Fr.44; (g) Fr.22.

andere Zuordnung zu den 4 Polypeptidketten des SDS-Systems. Bei der Molekulargewichtsbestimmung ermittelte ich mit 73000, 75000, 76000 und 78000 Werte, die von denen von Markl et al. (1979b) geringfügig abwichen. In Abb.12c setzt sich die SDS-Bande von CANCER 1 nicht ab von der CANCER 2-Bande; dies tritt in Abb.14c etwas deutlicher zutage. Dasselbe gilt auch für die zwei in Abb.12c nicht getrennt aufgelösten Banden des nichtrespiratorischen Proteins knapp oberhalb der Hämocyanin-Banden. Es gelang mir nicht, CANCER 1 und 2 voneinander zu trennen. Eine Dialyse gegen 4 M Harnstoff führt auch bei den Untereinheiten von CANCER zur allmählichen Denaturierung: Auf diese Weise behandelte CANCER 4 verhielt sich immunologisch defizient im Vergleich zum unbehandelten Monomer (Abb.13a). Die immunologisch zu CANCER 2 defiziente Untereinheit 1 konnte ich nur selten beobachten (vgl. Abb.11b;12d). Sie stellt jedoch wahrscheinlich kein Denaturierungsartefakt dar, da sie bei anderen Krabbenhämocyaninen in ähnlicher Form auftritt und dort, ebenso wie bei CANCER, durch eine distinkte SDS-Bande repräsentiert wird (Markl et al., 1979b; Markl und Kempster, 1981a; Raeder, 1984).

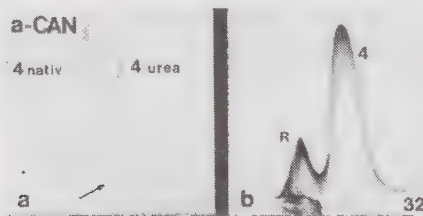


Abbildung 13:

Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit Untereinheit CANCER 4 gegen anti-CANCER Antiserum:

In der 1.Dim. war die Anode links. (a) Tandem-crossed IE mit unbehandelter CANCER 4 und unter Zusatz von 1M Harnstoff zum Puffersystem des Ionenaustauschers isolierter CANCER 4, die behandelte Untereinheit ist immunologisch defizient zu unbehandelten. (b) Fr.32 der Ionenaustauschchromatographie (vgl. Abb.12); R = reassozierte Untereinheit 4.

c) Die Untereinheiten des Hämocyanins aus OCYPODE

Die Untersuchung von OCYPODE-Hämocyanin im Elektronenmikroskop zeigte das Vorkommen von Dodekameren und Hexameren (Abb.15d). In der PAGE bei pH 8,8 erwies sich das 24S-Molekül als instabil. Es zerfiel vollständig in Hexamere und diese teilweise weiter in die Monomere (Abb.14b). Die Hexamerfraktion ist elektrophoretisch heterogen und weist 4 Proteinbanden auf (Abb.14b). Oberhalb der Hexamere wandert in der PAGE ein wahrscheinlich nicht respiratorisches Protein: die Bande war nach Dialyse gegen 0,05M Tris/HCl-Puffer von pH 8,8 in gleicher Intensität vorhanden, wogegen das Hämocyanin unter diesen Bedingungen quantitativ in die Untereinheiten 1-4 zerfiel (Abb.14a). Die Molekulargewichte der Untereinheiten wurden in der SDS-PAGE zu 75000 und 78000 bestimmt, wobei EURYPELMA-Hämocyanin und EURYPELMA-NRP als Referenz dienten (Abb.14c).

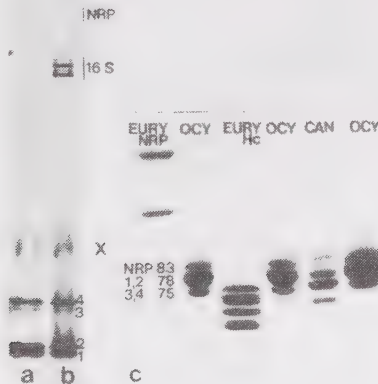


Abbildung 14:

Elektrophoretische Charakterisierung des Hämocyanins aus OCYPODE:

(a-c) Analytische PAGE (pH 8,8, Anode unten) von OCYPODE-Hc. (a,b) Native PAGE, 5-10% Gel; (b) undissoziiertes Material nach der präparativen Ultrazentrifugation der Hämolymphe (Pellet); (a) dissoziiertes Pellet, X = denaturiertes Protein; (c) SDS-PAGE mit β -Mercaptoethanol, 5-10% Gel; bei der Bestimmung der Molmassen ($\times 1/1000$) dienten das Hc und das NRP aus EURYPELMA und CANCER als Referenzen.

Die Zuordnung der Banden beider Elektrophoresesysteme erfolgte nach Isolierung der einzelnen Untereinheiten durch mikropräparative PAGE (Abb.15). Die Fraktionen I-VI entsprechen den Banden, die aus dem präparativen Gel herausgeschnitten wurden. Die kathodische Bande im Muster der SDS-PAGE (Mr 83000) war keiner Hämocyanin-Untereinheit zuzuordnen und repräsentiert vermutlich das NRP. Bei den bisher untersuchten Crustaceen wanderte das NRP in der SDS-PAGE stets dicht oberhalb der Polypeptidketten des Hämocyanins (Markl et al., 1979b). Die Untereinheiten 1 und 2 haben gleich Molekülmassen (Mr 75000), ebenso 3 und 4 (Mr 78000) (Abb.15b). Gegen das dissoziierte OCYPODE-Hämocyanin wurde ein Antiserum hergestellt. In der zweidimensionalen Immunelektrophorese ergaben sich vier Gipfel (Abb.15c). Der anodische Gipfel entspricht den elektrophoretisch mobileren Monomeren 1 und 2. Die Untereinheiten 3 und 4 bilden den kathodischen Gipfel, der mit dem anodischen verschmilzt. Der diffuse Gipfel über 3/4 besteht, wie weiter unten beschrieben, aus denaturiertem Hämocyanin. Der sehr kleine, vierte Gipfel, der in Abb.15c mit X bezeichnet wurde, konnte keiner Hämocyanin-Untereinheit zugeordnet werden und stellt wahrscheinlich das NRP dar. In der fused-Rocket sowie in crossed-Line Immunelektrophoresen trat die immunologische Identität der vier Monomere deutlich zutage (Abb.15e-i). In Abb.15a ist zu erkennen, daß die isolierten Fraktionen jeweils auch diffuse Banden ergaben, die im Dimerenbereich wanderten. Hierbei handelt es sich erfahrungsgemäß um denaturiertes Hämocyanin. Das Material war auch als zweite Line sichtbar (Abb.15f-i) und verschmolz mit dem diffusen, im Gesamtmuster über den Untereinheiten 3/4 gelegenen Gipfel, was dessen Identität mit denaturiertem Hämocyanin bestätigte. Im Vergleich mit den übrigen bisher untersuchten Krabben-Hämocyaninen (Markl und Kempfer, 1981a,b) fällt auf, daß bei OCYPODE sämtliche elektrophoretisch unterscheidbaren Untereinheiten miteinander kreuzreagieren.

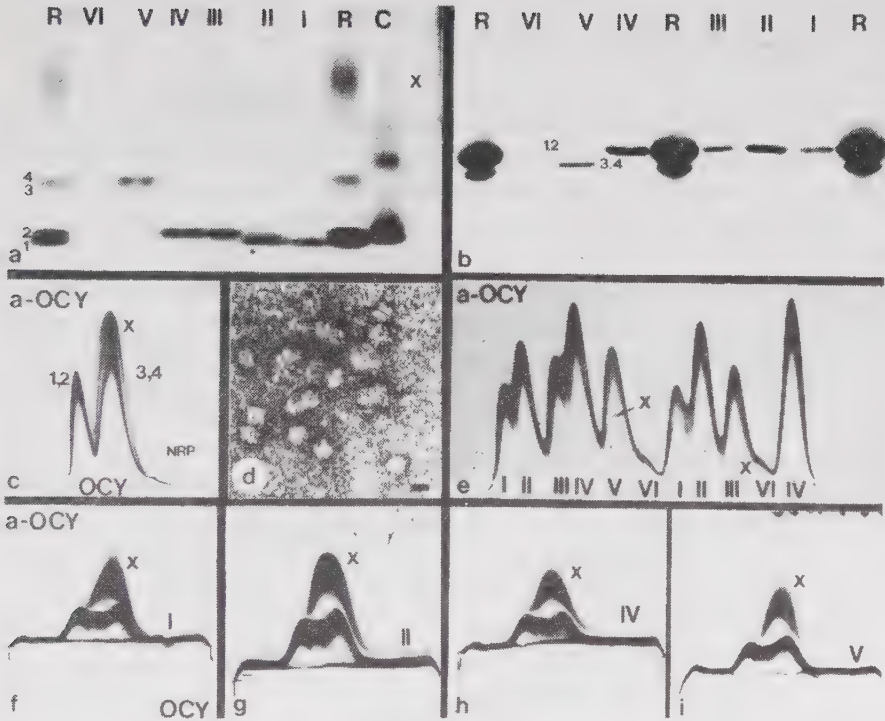


Abbildung 15:

Isolierung der Untereinheiten aus OCYPODE-Hämocyanin:

(d) Elektronenmikroskopische Aufnahme von OCYPODE-Hc; Primärvergrößerung: ca. 60000-fach; man erkennt Hc-Dodekamere und Hc-Hexamere. Die Länge des Balkens beträgt 10nm.

(a,b,e-i) Isolierung der Untereinheiten von OCYPODE-Hc durch mikropräparative PAGE; dabei wurden sechs Fraktionen erhalten, die mit I-VI bezeichnet wurden: (a,b) analytische PAGE der isolierten Fraktionen I-VI bei pH 8,8; R = dissoziiertes OCYPODE-Hc = in die mikropräparative PAGE eingesetztes Material; (a) native PAGE, 5-10% Gel; C = dissoziiertes CANCER-Hc; X = denaturiertes Protein im 7S-Bereich; 1-4 = Monomere; (b) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol, 7,5% Gel; (c,e-i) IE's von OCYPODE-Hc gegen anti-OCYPODE Antiserum; X = denaturiertes Hc; (c) zweidimensionale IE von dissoziiertem OCYPODE-Hc (entspricht R in Abb.15a,b); die Anode in der 1.Dim. war links. (e) Fused-Rocket IE mit den Fraktionen I-VI; (f-g) crossed-Line IE's mit den Fraktionen I, II, IV und V in der Line, sonst wie (c).

4. Die Hämocyane aus den Langusten *PALINURUS VULGARIS* und *PANULIRUS INTERRUPTUS* (Abt. Palinura)

a) Bisherige Befunde

Langusten enthalten ausschließlich hexameres (16S) Hämocyanin. Es wurden bisher Vertreter der Gattungen *PALINURUS*, *PANULIRUS* und *JASUS* untersucht (Eriksson-Quensel und Svedberg, 1936; Johnston et al., 1967; Kuiper et al., 1975; Robinson und Ellerton, 1977; Ellerton et al., 1977).

Das Hämocyanin aus der europäischen Languste *PALINURUS VULGARIS* dissoziiert im alkalischen Milieu in 4 Monomere mit Molekulargewichten zwischen 78000 und 90000 (Markl et al., 1979b). Die Monomere wurden von Markl und Kempster (1981a) als immunologisch miteinander verwandt beschrieben; allerdings konnten die Verhältnisse nicht eindeutig geklärt werden.

Das Hämocyanin der amerikanischen Languste *PANULIRUS INTERRUPTUS* setzt sich nach Markl et al. (1979b) aus 4, nach van Eerd und Folkerts (1981) aus 5 elektrophoretisch unterscheidbaren Monomeren zusammen. Diese wurden von van Eerd und Folkerts (1981) entsprechend ihren Molekulargewichten bezeichnet als 94(I)K, 94(II)K, 90(I)K, 90(II)K und 80K. Nach Folkerts und van Eerd (1981) sind die beiden 94K- und die beiden 90K-Einheiten immunologisch sehr nahe verwandt, während Kreuzreaktionen mit der 80K-Komponente nicht festgestellt werden konnten. Die 80K-Bande entspricht der Bande *PANULIRUS* 4 in der Nomenklatur von Markl et al. (1979b); die übrigen Untereinheiten entsprechen den Banden 1-3.

b) Eigene Ergebnisse

Ich dissoziierte nach Markl et al. (1979b) das 16S-Oligomer von *PALINURUS VULGARIS* durch Dialyse gegen Glycin/NaOH-Puffer von pH 9,6. Anschließend isolierte ich die 5S-Fraktion durch Gel-filtration. Gegen das 5S-Hämocyanin wurde ein Antiserum hergestellt, das in der zweidimensionalen Immunelektrophorese ein einziges homogenes Präzipitat mit den 4 Untereinheiten bildete (Abb. 16a). Ein immunologisch distinktes Verhalten der PAGE-Bande 3 wie bei Markl und Kempster (1981a) konnte ich niemals beobachten; in jenen Versuchen handelte es sich offenbar um ein

Denaturierungsartefakt: ein vergleichbares Präzipitat trat nach Dialyse der Untereinheiten gegen 4 M Harnstoff auf. Auch konnte ich niemals beobachten, daß sich die Untereinheit 1 als immunologisch defizient von den übrigen Komponenten abhebt, wie dies in der früheren Arbeit eindeutig der Fall war (siehe Abb. 1a bei Markl und Kempster, 1981a). Entweder war in meinen Versuchen die Auflösung in der ersten Dimension geringer oder das von mir hergestellte Antiserum erlaubte die Unterscheidung nicht, oder die frühere Komponente 1 war ein partiell denaturiertes Hämocyanin. Da ich bei PALINURUS die Untereinheiten nicht einzeln isolierte, bleibt diese Frage offen. Sie spielt allerdings für meine späteren Versuche zur interspezifischen Verwandtschaft keine Rolle; in diesen Versuche wurde stets die gesamte 5S-Fraktion eingesetzt.

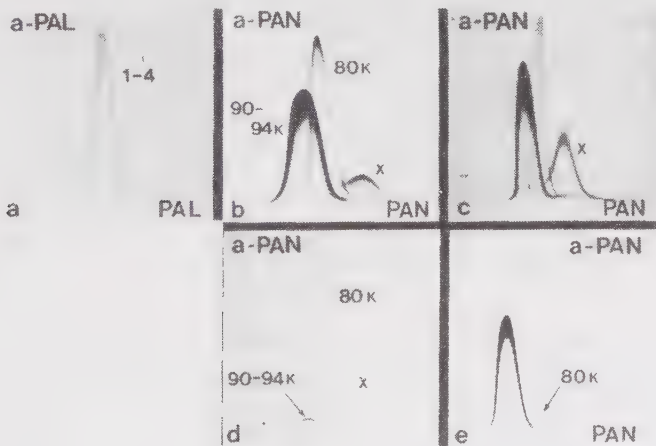


Abbildung 16:

Zweidimensionale Immunelektrophoresen zur Charakterisierung der Hämocyanine aus PALINURUS und PANULIRUS:

In (a-f) war die Anode der 1. Dim. links. (a) Dissoziiertes PALINURUS-Hc gegen anti-PALINURUS Antiserum; in (b-e) wurde anti-PANULIRUS Antiserum verwendet; X = denaturiertes Protein; (b) dissoziiertes PALINURUS-Hc; (c) Material wie in (b) nach dreiwöchiger Aufbewahrung bei pH 9,6 (4 Grad): die denaturierte Komponente X nimmt zu; (d) isolierte 80K-Untereinheit; (e) crossed-Line IE von Material wie in (b) mit der 80K-Untereinheit in der Line.

Im Gegensatz zu dem völlig homogenen Immunogipfel bei PALINURUS erhielt ich beim dissoziierten Hämocyanin aus PANULIRUS INTERRUPTUS in der zweidimensionalen Immunelektrophorese gegen anti-PANULIRUS Antiserum zwei Gipfel, abgesehen von einem als denaturiertes Material identifizierten Präzipitat, das bei längerer Lagerung des Hämocyanins allmählich größer wurde (Abb. 16b,c). Die Hauptmenge des Proteins befand sich in der anodischen Komponente. Von Prof. van Bruggen (Groningen/Niederlande) erhielt ich eine kleine Menge isolierter 80K-Untereinheit. Damit konnte der schmalere kathodische Gipfel in einem crossed-Line Experiment als 80K-Komponente identifiziert werden (Abb. 16e,f). Ebenso wie bei Folkerts und van Eerd (1981) erbrachte auch das von mir verwendete Antiserum keinen Hinweis auf eine immunologische Verwandtschaft zwischen der 80K- und den übrigen Komponenten des Hämocyanins aus PANULIRUS.

PANULIRUS enthält also wie CANCER zwei immunologisch verschiedene Typen von Untereinheiten, dagegen besitzen PALINURUS und OCYPODE nur je einen Typ.

5. Hämocyanin aus PAGURUS BERNHARDUS und GALATHEA SQUAMOSA (Abt. Anomura)

a) Bisherige Befunde

Die zu den Anomura gehörenden Thallassinidae (Maulwurfskrebse) besitzen neben einem 16S-Hämocyanin vor allem ein tetraedrisches vier-Hexamer (39S) (Svedberg, 1933; Roxby et al., 1974; Miller et al., 1977; van Bruggen, 1983). Dagegen enthalten zwei der fünf bisher untersuchten anderen Anomuren nur hexameres Hämocyanin: der Einsiedlerkrebs PAGURUS STRIATUS (Svedberg und Hedenius, 1934; Joubert, 1954) und der Furchenkrebs OEDIGNATHUS spec. (Terwilliger und Terwilliger, unveröffentlicht, zitiert in: Mangum, 1983). Bei den drei anderen wurde zusätzlich dodekameres Hämocyanin gefunden: bei den Galatheiden PACHYCHELIS RUDIS und PETROLISTES ERIOMERUS (Terwilliger und Terwilliger, zitiert in: Mangum, 1983) sowie bei dem Paguriden PAGURUS BERNHARDUS (Svedberg und Hedenius, 1934). Untersuchungen an Hämocyanin-Untereinheiten wurden bisher weder bei Einsiedlerkrebsen noch

bei Furchenkrebse publiziert.

b) Analyse der Untereinheiten

Die Hämocyane aus GALATHEA SQUAMOSA und PAGURUS BERNHARDUS bestehen nach meinen Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge zu 75% aus Dodekameren und zu 25% aus Hexameren (GALATHEA: 21,6S und 15,4S; PAGURUS: 22,4S und 15,1S; unkorrigiert) (Abb.17).

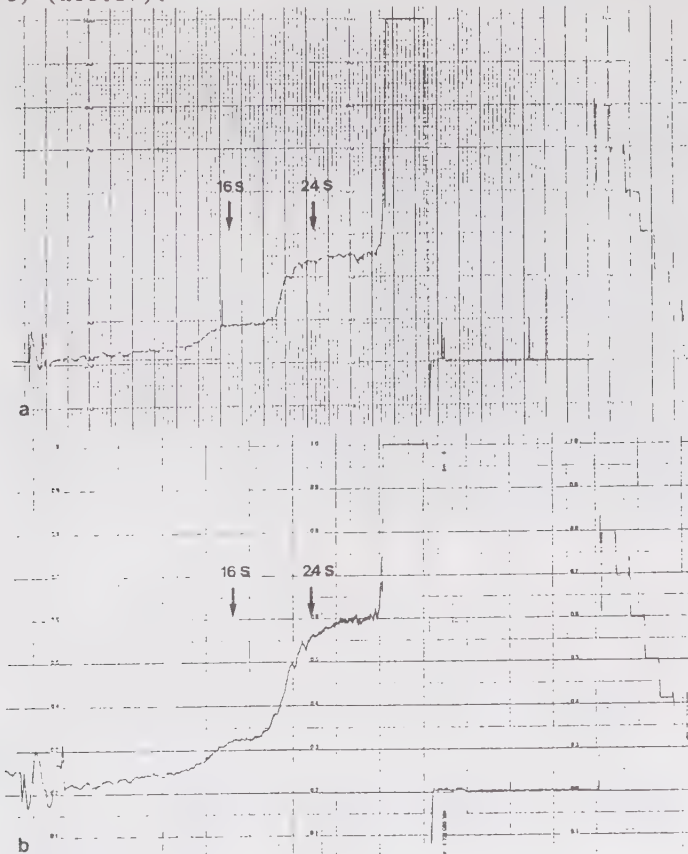


Abbildung 17:

Sedimentationsanalyse der Hämocyane aus PAGURUS (a) und GALATHEA (b) in der analytischen Ultrazentrifuge bei 36000 UpM, 40 Min. nach Erreichen dieser Umdrehungszahl; die Proteinkonzentration betrug 0,5 (a) und 0,8mg/ml; Puffer: 0,1M Tris/HCl, pH 7,5, 10mM Calciumchlorid. Nach den Schreiberdruckungen des UV-Scanners waren bei (a) und (b) 24S- und 16S-Hc-Moleküle nachweisbar.

Dies entspricht formal der 24S- bzw. 16S-Komponente. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PAGURUS-Hämocyanin zeigen neben Hexameren auch Dodekamere, bei denen zwei gegeneinander um 90 Grad gedrehte Hexamere verknüpft sind (Abb.18a). Die Hämolymphe aus PAGURUS enthielt zudem ein mit ca. 16S sedimentierendes, nichtrespiratorisches Protein, das mit der präparativen Ultrazentrifuge angereichert werden konnte. Im EM

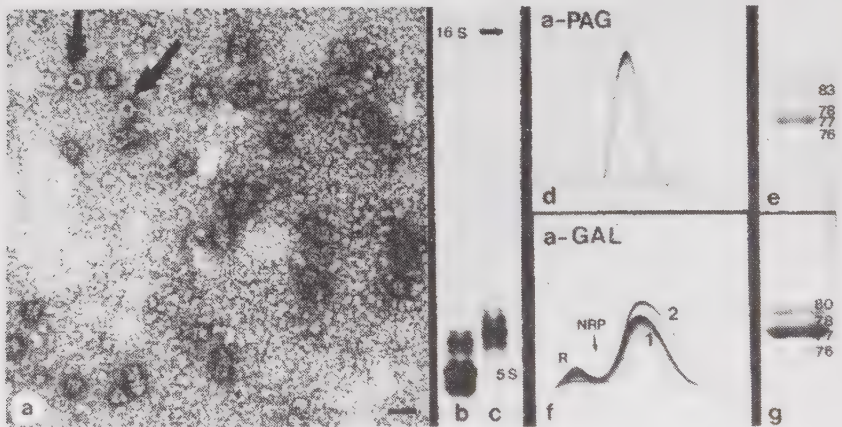


Abbildung 18:

Charakterisierung der Hämocyanine aus PAGURUS und GALATHEA: (a) Elektronenmikroskopisches Bild von PAGURUS-Hc bei ca. 60000-facher Primärvergrößerung; der Balken entspricht 20nm. Man erkennt Hc-Hexamere und Dodekamere. Die Pfeile markieren das ringförmige NRP. (b,c,e,g) Analytische PAGE (pH 8,8) der Hc's aus PAGURUS (b,e) und GALATHEA (c,g); die Anode war unten. (b,c) Native PAGE, 5-10% Gel; (b) bei pH 8,8 dissoziiertes PAGURUS-Hc; (c) bei pH 9,6 dissoziiertes GALATHEA-Hc: hier blieb stets ein Teil des 16S-Materials undissoziiert. (e,g) SDS-PAGE mit β -Mercaptoethanol, 7,5% Gel; (e) PAGURUS-Hc; (g) GALATHEA-Hc; die Molekulargewichte der jeweils vier SDS-Banden sind in $M_r \times 1/1000$ angegeben. (d,f) Zweidimensionale IE's, die Anode der 1.Dim. befand sich links. (d) Dissoziiertes PAGURUS-Hc gegen anti-PAGURUS Antiserum; (f) dissoziiertes GALATHEA-Hc gegen anti-GALATHEA Antiserum; R = undissoziierter 16S-Anteil; die beiden Präzipitate der Hc-Monomere wurden mit 1 und 2 bezeichnet.

erscheint es als ringförmige Struktur mit ca. 10 nm Durchmesser (Abb.18a). PAGURUS-Hämocyanin dissoziierte bei Dialyse gegen 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,8, 1 mM EDTA, 4 Grad Celsius, binnen 24 Stunden quantitativ in Material mit einem Sedimentationskoeffizienten von 5S, gegen das ein Antiserum hergestellt wurde. In der nativen PAGE konnten 7, in der SDS-PAGE 4 Banden identifiziert werden (Abb.18b,e). Die letzteren wiesen die Molekulargewichte 76000, 78000, 79000 und 83000 auf.

Trotz der ausgeprägten elektrophoretischen Heterogenität und der unterschiedlichen Molekulargewichte zeigte sich in der zweidimensionalen Immunelektrophorese nur ein einziger homogener Gipfel, was bedeutet, daß sämtliche Untereinheiten immunologisch identisch sind (Abb.18d).

Im Gegensatz zum Hämocyanin aus PAGURUS dissoziierte GALATHEA-Hämocyanin selbst bei einer 48-stündigen Dialyse gegen pH 9,6 (Glycin/NaOH-Puffer) in Gegenwart von 10 mM EDTA nur partiell in Untereinheiten. Etwa 50% des Materials verblieben in der 16S-Form (Abb.18c). Auf Grund der geringen mir zur Verfügung stehenden Menge von nur 7 mg Protein verzichtete ich auf eine Reinigung der 5S-Fraktion durch Gelfiltration und stellte nur gegen das Gesamt-Dissoziat ein Antiserum her. In der nativen PAGE ließ sich ein sehr dichtes Muster aus 9 Banden erkennen, denen 4 SDS-Banden gegenüberstanden (Abb.18c,g). Die Molekulargewichte wurden zu 76000, 77000, 78000 und 80000 bestimmt. In der zweidimensionalen Immunelektrophorese zeigten sich zwei nicht identische Präzipitate, die anodisch in einem dritten Gipfel verschmolzen (Abb.18f). Da das anodische Präzipitat wesentlich deutlicher war, handelt es sich hierbei sicher um den undissoziierten Hämocyaninanteil, während die beiden kathodischen Gipfel 1 und 2 die Untereinheiten repräsentieren dürften. Eine Reihe schwacher Präzipitate im Hintergrund gehen m.E. auf nichtrespiratorische Proteine zurück; sie kreuzreagierten weder mit dem Hämocyanin-Oligomer, noch wurden sie in den späteren Verwandtschaftsanalysen von heterologen anti-Hämocyanin Antiseren präzipitiert. Die Verunreinigung mit so viel nichtrespiratorischem Protein ließ zunächst Zweifel aufkommen, ob der S-Wert von 21,6 tatsächlich auf das Hämocyanin zurückgeht. Das UV-Spektrum zeigte jedoch ein Verhältnis von $E_{280}/E_{340} = 4,93$, so daß der bei weitem überwiegende Anteil der Blutproteine Hämocyanin darstellen mußte. Insofern

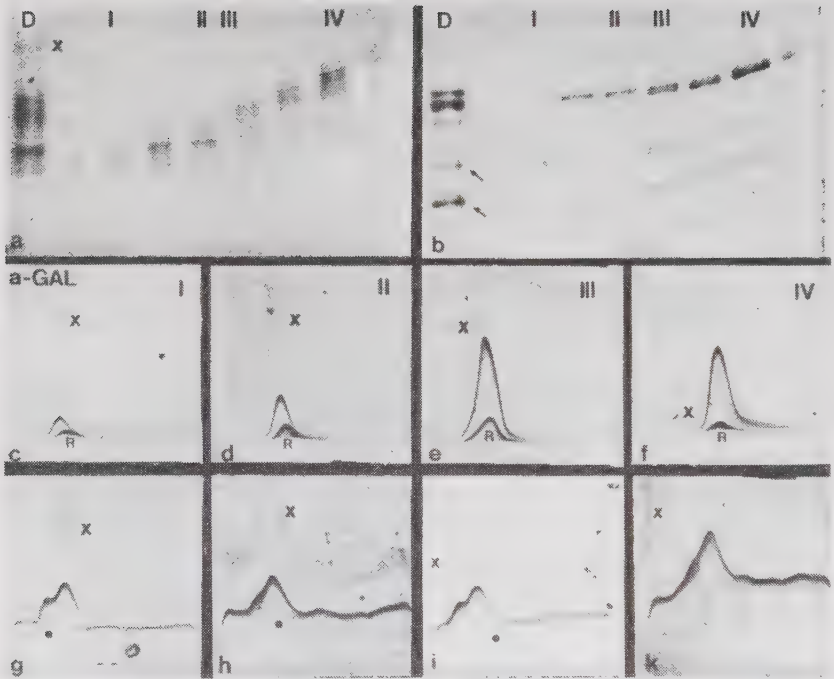


Abbildung 19:

Isolierung der Untereinheiten von GALATHEA-Hämocyanin durch mikropräparative PAGE und Zuordnung der gewonnenen Fraktionen zu den Mustern aus Elektrophorese und Immunelektrophorese:

(a,b) Analytische PAGE (pH 8,8) der Fraktionen I-IV; D = dissoziiertes GALATHEA-Hc = Ausgangsmaterial bei der mikropräparativen Elektrophorese; die Anode war in beiden Fällen unten. (a) Native PAGE, 5-10% Gel; gezeigt ist nur der Monomerebereich; X = denaturiertes Protein; (b) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol, 7,5% Gel; die Pfeile markieren durch Proteolyse entstandene Proteinbanden. (c-k) Zweidimensionale IE's mit den Fraktionen I-IV gegen anti-GALATHEA Antiserum; X = denaturiertes Hc; in der 1. Dim. befand sich die Anode jeweils links. (c-f) Fraktionen I-IV; R = reassoziertes Material; (g-k) crossed-Line IE's mit dissoziiertem GALATHEA-Hc und den Fraktionen I-IV in der Line; der Monomergipfel 2 (vgl. Abb. 18f) wird jeweils durch das denaturierte Hc herausgehoben; Gipfel 1 verschmilzt mit sämtlichen in (a) identifizierten Fraktionen. Die durchgezogenen Lines wurden in g-i mit schwarzen Punkten markiert.

bestehen am Vorkommen hauptsächlich dodekameren Hämocyanins in der Hämolymphe von GALATHEA keine Zweifel.

Die Untereinheiten des GALATHEA-Hämocyanins wurden durch mikropräparative PAGE isoliert und gelelektrophoretisch sowie durch crossed-Line Immunelektrophoresen den Banden des Gesamtmusters zugeordnet (Abb.19). Die Fraktionen I-IV entsprechen den Hauptbanden der insgesamt neun aus dem präparativen Gel herausgeschnittenen Banden. In sämtlichen isolierten Fraktionen I-IV (Abb.19c,f) waren immunologisch drei Gipfel unterscheidbar: Der kleine, stark kontrastierte Gipfel stellte reassoziertes Material dar (dies ging aus dem in Abb.19a nicht mitabgebildeten 16S-Bereich des PAGE-Gels hervor) und wurde mit R bezeichnet. Der monomere und der reassozierte Anteil der Fraktionen I-IV verschmolz in den crossed-Line Experimenten von Abb.19g-k mit dem Gipfel 1 des GALATHEA-Gesamtmusters (vgl. Abb.18f), wobei der reassozierte Anteil den durchgezogenen Lines entspricht. Bei dem dritten Gipfel, der in allen Fraktionen als diffuses Präzipitat auftrat (Abb.19c-f: X), handelte es sich um denaturiertes Hämocyanin. In den crossed-Line Versuchen verschmolz der diffuse Anteil jeweils mit dem Gipfel 2 des Gesamtmusters (Abb.18f, X in Abb.19g-k). Letzterer stellt somit wahrscheinlich denaturiertes Hämocyanin dar. Im Hämocyanin aus GALATHEA ist also wie bei PAGURUS vermutlich nur ein immunologisch distinkter Typ von Monomeren enthalten. Im Bandenmuster der nativen PAGE (Abb.19a) sind sämtliche herausgeschnittenen Fraktionen den Referenzbanden (D) zuzuordnen, wogegen in der SDS-PAGE (Abb.19b) die gleichen Fraktionen nur den beiden mittleren Banden des Referenzmusters aus Abb.18g und D in Abb.19b entsprechen. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich nur bei den beiden mittleren Proteinbanden (Mr 78000 und 77000; Abb.18g und Abb.19b) um Hämocyanin und bei der schwereren sowie der leichteren (Mr 80000 und 76000) um nichtrespiratorisches Protein. Die mit Pfeilen markierten Banden in Abb.19b entsprechen wahrscheinlich proteolytischen Abbauprodukten (dies wurde nicht näher untersucht) der beiden Hämocyaninbanden; sie sind auch in den Fraktionen I-IV enthalten, in denen das NRP fehlt.

6. Hämocyanin aus der Garnele *PALAEMON FABRICII*

a) Bisherige Befunde

Von den 13 Familien der Dekapoden-Unterordnung Natantia wurde bisher nur bei Vertretern von drei Familien der Aggregationszustand des Hämocyanins untersucht. Die Felsgarnele *PALAEMON* (= *MACROBRACHIUM*) *FABRICII* (Fam. Palaemonidae) hat 16S-Hämocyanin; der genaue Wert war 16,9S (Svedberg, 1933). *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* besitzt neben 16S-Hämocyanin in geringer Menge auch ein mit 24S sedimentierendes Protein (Bonaventura et al., 1979). Auch *PANDALUS BOREALIS* (Fam. Pandalidae) enthält Spuren einer 24S-Komponente neben überwiegendem 16S-Hämocyanin (Eriksson-Quensel und Svedberg, 1936). Ähnliche Verhältnisse beschrieben Ellerton und Anderson (1981) bei *PENAEUS MONODON* (Fam. Penaeidae), wobei das 24S-Molekül als Hämocyanin identifiziert wurde. Brouwer et al. (1978) berichten bei *PENAEUS SETIFERUS* dagegen lediglich von 16S-Aggregaten. Untereinheiten aus Garnelen-Hämocyanin wurden bisher nur bei den zwei *PENAEUS*-Arten näher untersucht. Beide konnten nur nach Denaturierung dissoziiert werden. Das Hämocyanin aus *P. SETIFERUS* zerfiel bei Behandlung mit SDS in 2 Banden mit Molekulargewichten von 77000 und 82000 (Brouwer et al., 1978). Bei *P. MONODON* konnten elektrophoretisch 3 Monomere unterschieden werden; eventuell ist als vierte Komponente noch eine dimere Untereinheit vorhanden (Ellerton und Anderson, 1981).

b) Eigene Untersuchungen

Ich bestimmte beim Hämocyanin aus *PALAEMON FABRICII* einen Sedimentationskoeffizienten von 16,5S (unkorrigiert). Bereits bei pH 8,8 in 0,05 M Tris/HCl-Puffer mit 1 mM EDTA dissoziierte das Hämocyanin über Nacht weitgehend in Untereinheiten. In der nativen PAGE ließen sich 5 Monomere ("1" bis "5") sowie dimeres und hexameres Material unterscheiden. Die Monomere wurden durch mikropräparative Gelelektrophorese isoliert (Abb. 20a-e) und die dadurch erhaltenen Hauptfraktionen I-III näher charakterisiert. Die isolierten Banden 3 und 5 waren in der Lage zu dimerisieren; diese Dimeren wanderten in der PAGE an derselben Position wie das im Gesamtmuster beobachtete dimere Material (Abb. 20b). Es

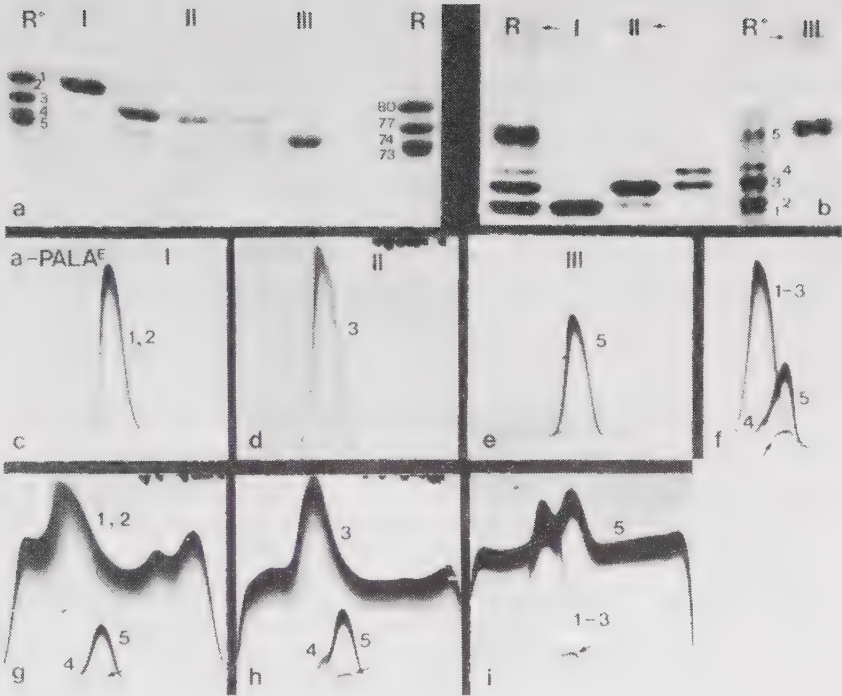


Abbildung 20:

Untersuchung der durch mikropräparative PAGE gewonnenen Untereinheiten-Fractionen des bei pH 8,8 dissoziierten Hämocyansins aus PALAEMON:

(a,b) Analytische PAGE bei pH 8,8 mit den isolierten Fraktionen I-III; die Anode war jeweils unten; R = dissoziiertes PALAEMON-Hc. (a) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol, 7,5% Gel; bei R sind die Molekulargewichte $\times 1/1000$ der einzelnen Monomere aufgetragen; R* = nachträglich eingefügter Teil eines anderen Gels, bei dem die Banden 4 und 5 deutlich als Doppelbande erkennbar sind. (b) Native PAGE, 5-10% Gel; R* = nachträglich eingefügter Gelstreifen eines anderen Gels mit besserer Auflösung, bei dem die Banden 1 und 2 deutlich getrennt wurden; Pfeile: dimerisiertes Hc. (c-i) Zweidimensionale IE's mit anti-PALAEMON Antiserum, die Anode der 1. Dim. befand sich links. (c-e) Fraktionen I, II und III; (f) PALAEMON-Gesamtmuster; der Pfeil markiert das vermutliche NRP; (g-h) crossed-Line IE's mit dem PALAEMON-Hc Dissoziat (vgl. f) und den Fraktionen I, II und III in der Line; Pfeil: NRP.

wurde nicht untersucht, ob es sich hier um eine native Dimerisierung oder um die Begleiterscheinung einer Denaturierung handelte. Auf keinen Fall enthält das dimere Material zusätzliche Untereinheiten. In der SDS-PAGE ergaben sich vier Banden, denen Molekulargewichte von 73000, 74000, 77000 und 80000 zugeordnet werden konnten. Mit Hilfe der mikropräparativ isolierten Banden I-III erfolgte die Korrelation zwischen den beiden PAGE-Mustern (Abb.20a,b). Immunochemisch zeigten sich bei Verwendung von anti-PALAEON Antiserum 4 Komponenten. Drei davon wurden durch crossed-Line Immunelektrophoresen den beiden PAGE-Mustern zugeordnet (Abb.20g-i). Die elektrophoretisch distinkten Banden 1 und 2 besaßen das gleiche Molekulargewicht. Bande 3 enthielt neben etwas 2 noch eine leichtere Polypeptidkette, bei der es sich um ein Abbauprodukt handeln könnte. PALAEON 1, 2 und 3 waren immunologisch identisch und nicht verwandt mit PALAEON 4 und 5. Untereinheit 4 war immunologisch defizient im Vergleich zu 5 und wurde deshalb durch crossed-Line Immunelektrophorese nicht gesondert untersucht.

Insgesamt ergab sich somit, daß das 16S-Hämocyanin aus der Garnele PALAEON FABRICII aus zwei immunologisch distinkten Grundbausteinen zusammengesetzt ist. Allerdings läßt das Gesamtmuster eine schwache Kreuzreaktion zwischen 1/2/3 und 5 erkennen (Abb.20f). Der kleine kathodische Immunogipfel war mit keiner der isolierten Hämocyanin-Untereinheiten verwandt und stellt vermutlich kein Hämocyanin dar.

7. Hämocyanin aus dem antarktischen Krill, EUPHAUSIA SUPERBA

a) Bisherige Befunde

Bei EUPHAUSIA handelt es sich um einen Vertreter der Ordnung Leuchtkrebse (Euphausiacea), die von den 16 Malakostrakenordnungen den Dekapoda am nächsten stehen und mit diesen zur Überordnung Eucarida zusammengefaßt werden. Von Euphausiaceen liegen bisher keine Untersuchungen bezüglich ihres Hämocyanins vor. Außer Hämocyaninen von dekapoden Krebsen wurden bisher lediglich Hämocyanine von Vertretern der Ordnungen Stomatopoda und Isopoda untersucht. Eine Übersicht über die betreffende Literatur findet

sich bei Ellerton et al. (1983).

Der Stomatopode *SQUILLA MANTIS* (Fangheuschreckenkrebs) z.B. besitzt ein mit 24S sedimentierendes Hämocyanin, das sich im Elektronenmikroskop als zwei-Hexamer darstellt (van Bruggen, 1983). Die Untereinheiten-Struktur ist unbekannt.

Bei den Isopoden *LIGIA EXOTICA* (Terwilliger et al., 1979) und *LIGIA PALLASII* (Terwilliger, 1982) wurde sowohl 24S- als auch 16S-Hämocyanin gefunden. Bei *LIGIA PALLASII* wurden zwei Untereinheitentypen beschrieben, von denen einer im nativen 16S-Molekül fehlt und vielleicht im Dodekamer die Brücke zwischen den hexameren Hälften formt (Terwilliger, 1982). *BATHYNOMUS GIGANTEUS* besitzt dagegen nur hexameres Hämocyanin, das sich aus 3 elektrophoretisch unterscheidbaren Monomeren zusammensetzt (Van Holde und Brenowitz, 1981).

b) Isolierung des Krill-Hämocyanins

Die Gelfiltration (Biogel A5m) der Hämolymphe von Krill ergab ein zweigipfeliges Elutionsprofil mit einem Plateau zwischen den beiden Gipfeln (Abb.21a). Der erste Proteingipfel (I) enthielt nach Atomabsorptionsanalyse kein Kupfer. Offenbar lag hier ein nichtrespiratorisches Protein vor, das in der PAGE in der Region kathodisch von 24S-Hämocyanin wanderte (Abb.21b). In der analytischen Ultrazentrifuge sedimentierte es auch bei 44000 UpM noch nicht, sondern schwamm auf der Oberfläche des Lösungsmittels, was auf einen erheblichen Lipidanteil schließen läßt. Das als Gipfel II eluierte Protein war ein mit 14,5S (unkorrigiert) sedimentierendes Hämocyanin, was formal dem 16S-Typ entspricht. Die Hämocyanin-Natur ging aus dem UV-Spektrum hervor (Abb.21d).

c) Analyse der Untereinheiten

Krill-Hämocyanin erwies sich als sehr schwer dissoziierbar, ähnlich wie dies von Brouwer et al. (1978) für das Hämocyanin aus *PENAEUS SETIFERUS* beschrieben worden war. Durch 48-stündige Dialyse bei 4 Grad Celsius gegen Bicarbonatpuffer bei pH 10,1, 10 mM EDTA oder bei Raumtemperatur gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, 10 mM EDTA, in Gegenwart von 4 M Harnstoff konnte eine 5S-Fraktion erhalten werden, die jedoch insbesondere bei Verwen-

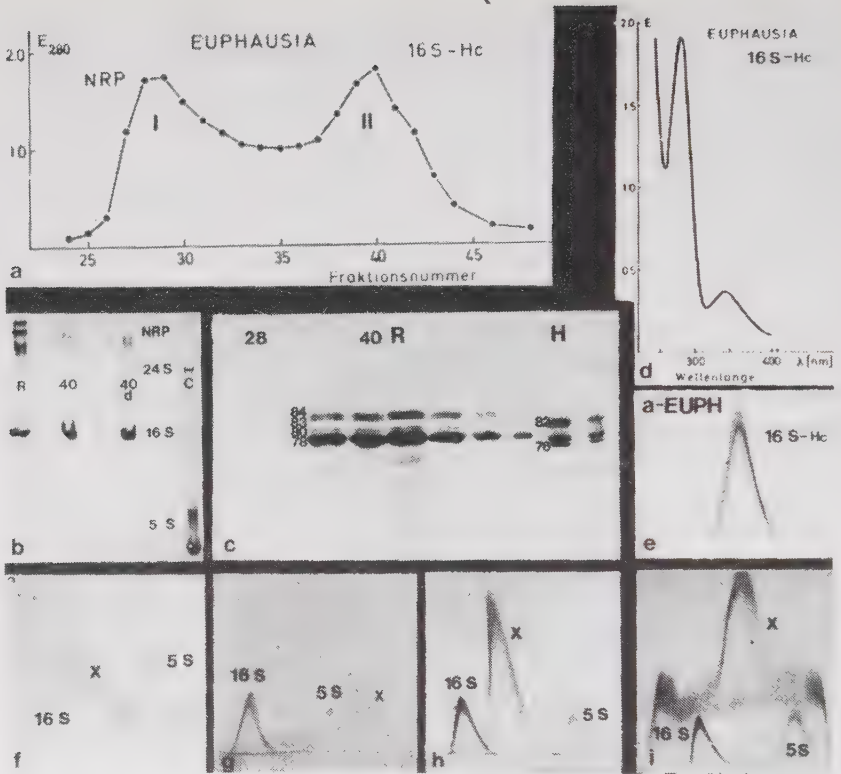


Abbildung 21:

Isolierung und Charakterisierung des Hämocyansins aus EUPHAUSIA:

(a) Elutionsprofil der Gelfiltration der Hämolympheproteine über Biogel A5m bei pH 7,5; die Gipfelfraktionen wurden in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. (b,c) Analytische PAGE bei pH 8,8 mit ausgewählten Fraktionen der Gelfiltration; Anode unten; R = Material das in die Gelchromatographie eingesetzt wurde. (b) Native PAGE, 5-10% Gel; 40 = Fr.40; 40d = Fr.40 nach Dialyse gegen Dissoziationspuffer von pH 10,1; beachte die schwache Bande im 5S-Bereich; C = CANCER 24S-Hc; (c) SDS-PAGE mit β -Mercaptoäthanol; 7,5% Gel; H = HOMARUS-Hc; beachte das Fehlen von Banden bei Fr.28; die ermittelten Molgewichte wurden in Mg x 1/1000 angegeben. (d) Absorptionsspektrum der 16S-Hc-Fraktion aus EUPHAUSIA. (e-i) Zweidimensionale IE's mit EUPHAUSIA-Hc gegen anti-EUPHAUSIA Antiserum; die Anode der 1.Dim. war links; X = denaturiertes Hc. (e) Undissoziiertes 16S-Hc; (f,g) teilweise in Monomere dissoziiertes Hc; (h) Material wie in (g), das jedoch über mehrere Wochen bei 4 Grad in pH 10,1-Puffer gelagert worden war; beachte den hohen, diffusen Gipfel X; (i) Fr.28 in der Line bei einem crossed-Line Versuch mit Material wie in (h): das denaturierte Material X verschmilzt teils mit dem Protein aus Fr.28, teils zieht sich die Line durch den X-Gipfel hindurch, was für die Heterogenität des denaturierten Materials spricht.

dung von Harnstoff zur Denaturierung neigte und zudem stets von viel 16S-Hämocyanin begleitet war. Bei frisch dissoziiertem Material ließen sich in der PAGE 4 sehr diffuse monomere Banden nachweisen, denen 4 SDS-Banden mit Molekulargewichten von 78000, 80000, 83000 und 84000 gegenüberstanden (Abb.21c). In der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit einem Antiserum, das gegen dissoziiertes Gipfel II-Material hergestellt worden war, erwiesen sich die 16S-Fraktion als einheitlich (Abb.21e) und die 4 Monomere als immunologisch identisch (Abb.21f). Bei Aufbewahrung von dissoziiertem Material bei 4 Grad über mehrere Wochen hinweg ging das Protein in der zweidimensionalen Immunelektrophorese zunehmend in ein diffuses Präzipitat über, welches denaturiertes Hämocyanin darstellte (Abb.21g,h). Überraschenderweise verschmolz dieses Präzipitat in der crossed-Line Immunelektrophorese mit dem Proteinmaterial aus Gipfel I der Gelfiltration (Abb.21i), das andererseits trotz mehrerer Versuche in der SDS-PAGE keine Hämocyaninbanden zeigte (Abb.21c). Gegen das spezifisch leichte, nichtrespiratorische Protein waren vermutlich ebenfalls Antikörper im Antiserum vorhanden; jedenfalls war das für die Immunisierung verwendete Hämocyanin aus Gipfel II mit Gipfel I-Material verunreinigt (Abb.21b). Ich konnte nicht klären, welche der folgenden drei Möglichkeiten zutrifft: (a) Denaturiertes Krill-Hämocyanin weist identische immunologische Eigenschaften auf wie das lipidhaltige Proteinmaterial aus Gipfel I, vielleicht weil dieses ebenfalls denaturiert ist. (b) Gipfel I enthält einen Anteil denaturierten Hämocyanins, der das Line-Protein in Abb.19i repräsentiert. (c) Es gibt überhaupt kein nichtrespiratorisches Protein, sondern nur ein durch Denaturierung verändertes Hämocyanin, an dessen hervorgekehrtes hydrophobes Inneres sich eine Lipidkomponente assoziiert hat. In jedem Fall bleibt das negative Ergebnis der SDS-PAGE ein Rätsel (Fr.28 in Abb.21c). Wegen der ungünstigen Umstände, unter denen das Krill-Blut in der Antarktis gewonnen und wochenlang gelagert worden war, verzichtete ich auf eine weitere Analyse dieses Problems und vertraute nur den Ergebnissen, die ich mit der eindeutig nativ gebliebenen 16S-Komponente gewann. Auf Grund der immunologischen Homogenität der Untereinheiten und der Instabilität des 5S-Materials wurde in den Versuchen zur interspezifischen Verwandtschaft der Hämocyanine meist das undissoziierte 16S-Molekül eingesetzt.

B) ZWISCHENARTLICHE KORRELATION DER HÄMOCYANIN-UNTEREINHEITEN

1. Stand der Forschung

Seit langem macht man sich im Rahmen der serologischen Taxonomie immunologische Homologiebeziehungen zwischen Proteinmolekülen zunutze (Nutall, 1902; Erhardt, 1929). Boyden (1942) sowie Leone (1949; 1950a,b; 1956) untersuchten die immunologische Verwandtschaft der Seren von dekapoden Krebsen aus den Abteilungen Brachyura, Astacura und Palinura mit Hilfe des quantitativen Präzipitintests von Heidelberger und Kendall (1935). Als eng verwandt erwiesen sich, analog zur konventionellen morphologischen Systematik, die brachyuren Krabbenfamilien Portunidae, Xanthidae und Cancridae; weiter distanziert standen – auch untereinander – die Familien Majidae, Ocypodidae, Calappidae und Goneplacidae. Die immunologische Verwandtschaft zwischen den Seren aus verschiedenen Reptantia-Abteilungen wurde dagegen als äußerst gering beschrieben.

Aus heutiger Sicht ist für diese früher gefundenen serologischen Verwandtschaften (oder Distanzen) in erster Linie das Hämocyanin als Hauptkomponente der Blutproteine verantwortlich (vgl. auch Leone, 1949; 1956). Allerdings könnten von Fall zu Fall auch nichtrespiratorische Proteine eine Rolle gespielt haben (vgl. Markl et al., 1979b). Die in den folgenden Jahren mit verfeinerten immunologischen Methoden durchgeführten Vergleiche von gereinigten Hämocyaninen bestätigten im allgemeinen die älteren Befunde (z.B. Amkraut et al., 1969; Jaccarini und Harris, 1975; Rochu et al., 1978; Rochu und Fine, 1978; Senkbeil und Wriston, 1981). Insbesondere wurde nach wie vor keinerlei immunologische Kreuzreaktion zwischen den Hämocyaninen aus verschiedenen Reptantia-Abteilungen beschrieben, sondern im Gegenteil die Abwesenheit solcher Kreuzreaktionen betont. Untersucht wurden dabei z.B. die Kombinationen CANCER MAGISTER/PANULIRUS INTERRUPTUS (Amkraut et al., 1969) und HOMARUS AMERICANUS/PANULIRUS REGIUS (Senkbeil und Wriston, 1981). Erst der Einsatz der zweidimensionalen Immunelektrophorese brachte hier neue Erkenntnisse. So konnten Lamy et al. (1981a) Hexamere aus der 94K-Untereinheit von PANULIRUS-Hämocyanin mit einem anti-UCA Antiserum präzipitieren (UCA ist die brachyure Winkerkrabbe). Die 80K-Einheit von

PANULIRUS erwies sich als verwandt zum Hämocyanin aus dem Flußkrebse *CHERAX DESTRUCTOR* (Lamy et al, 1981a). Die Untersuchungen von Markl und Kempster (1981b) ergaben eindeutig immunologische Kreuzreaktionen zwischen Hämocyanin-Untereinheiten mehrerer Krabben und denen der Gattungen *PALINURUS*, *HOMARUS* und *ASTACUS*, wobei das Konzept der phylogenetisch konservativen bzw. variablen Untereinheiten aufgestellt wurde.

2. Zur Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden zwischenartliche immunologische Verwandtschaften mit immunoelektrophoretischen Techniken analysiert. Die Reaktionen der Identität, partiellen Identität sowie Nicht-Identität wurden dabei nach den Kriterien von Grubb (1972) sowie Bock und Axelsen (1973) beurteilt. Nach Prager und Wilson (1971) werden zwei globuläre Proteine, bei denen die Homologie der Aminosäuresequenzen geringer als 60-70% ist, nicht mehr als immunologisch verwandt erkannt. Mehr als 90% Übereinstimmung ist korreliert mit immunologischer Identität. Allerdings hatten Nisonoff et al. (1970) schon früher am Cytochrom c gezeigt, daß bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure die immunologischen Eigenschaften eines Proteins entscheidend beeinflussen kann. Heute hat sich allgemein die Vorstellung durchgesetzt, daß in erster Linie die Konformation eines Proteins für seine immunologischen Reaktionen verantwortlich ist (Reichlin et al., 1964; Crumpton, 1974; Baty und Lazdunsky, 1979).

Beim Aufbau einer Quartärstruktur treten Oberflächenbereiche der Proteinuntereinheiten miteinander in Kontakt, und zwar mit Ausnahme von Disulfidbrücken nicht kovalent. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit der nicht kovalenten Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Da die Funktion eines Proteins von dessen Konformation abhängt, kann man demnach davon ausgehen, daß immunologisch verwandte Untereinheiten aus verschiedenen Hämocyaninen wahrscheinlich ähnliche funktionelle Aufgaben erfüllen. Dies konnte am Beispiel mehrerer Cheliceraten-Hämocyanine gezeigt werden (Review: Linzen, 1983). Verwandtschaftliche Distanzen können immunoelektrophoretisch jedoch bestenfalls semiquantitativ erfaßt werden (Bock und Axelsen, 1973). Am geeignetsten ist hier die Rocket-Technik mit Planimetrie der Gipfelflächen. Genaue

quantitative Methoden wie Mikrokomplementfixierung oder Radioimmunoassay sind relativ aufwendig. Um solche Techniken später gezielt einsetzen zu können, mußte erst einmal mit qualitativen Methoden ein Überblick über die zwischenartlichen immunologischen Kreuzreaktionen der Hämocyanin-Untereinheiten geschaffen werden. Dies ist Gegenstand des folgenden Abschnitts dieser Arbeit.

3. Ausgangspunkt: Das Hämocyanin der brachyuren Krabben

Das von Markl und Kempster (1981b) beschriebene Phänomen konservativer und variabler Untereinheiten bei Krabben-Hämocyaninen (vgl. S.3), das die Autoren bei der Untersuchung der Hämocyanine von *CANCER*, *CARCINUS* UND *HYAS* entdeckten, wurde durch von mir mitgeteilte Experimente von Raeder (Zulassungsarbeit, 1984) an *MAJA SQUINADO* und *CALLINECTES SAPIDUS* weiter bestätigt.

Die Experimente mit dem Hämocyanin aus der Geisterkrabbe *OCYPODE QUADRATA* ergaben das Fehlen einer variablen Untereinheit: Anti-*OCYPODE* Antiserum erkannte nur die drei elektrophoretisch mobileren Komponenten *CANCER* 1, 2 und 3. Die variable Untereinheit *Cancer* 4 wurde von anti-*OCYPODE* Antiserum nicht präzipitiert (Abb.22a,b). Mit anti-*CANCER* Antiserum gegen *OCYPODE*-Hämocyanin erhielt ich dagegen die gleichen Präzipitate wie mit dem homologen anti-*OCYPODE* Antiserum (Abb.22c,d). Das Auftreten konstanter und variabler Untereinheiten ist also offenbar keine generelle Eigenschaft der Krabben-Hämocyanine. Da *OCYPODE* ein 24S-Hämocyanin besitzt (J.Bonaventura, pers. Mitteilung), ist die variable Untereinheit auch kein essentieller Strukturbaustein des Dodekamers. Dennoch ist die Trennung der Monomere von Krabben-Hämocyaninen in zwei immunologisch verschieden reagierende Typen weit verbreitet, und die konservative Untereinheit trat bei allen bisher untersuchten Arten auf. Dem wurde Rechnung getragen durch die Einführung einer neuen Nomenklatur, die interspezifische Vergleiche erleichtern sollte. Die konservativen Monomere wurden mit dem Index "alpha" versehen, die variablen mit dem Index "beta". *CANCER*-Hämocyanin setzt sich demnach aus folgenden Untereinheiten zusammen: 1/2/3-alpha, 4-beta, *OCYPODE*-Hämocyanin besteht aus den Untereinheiten 1/2/3/4-alpha (Abb.22).

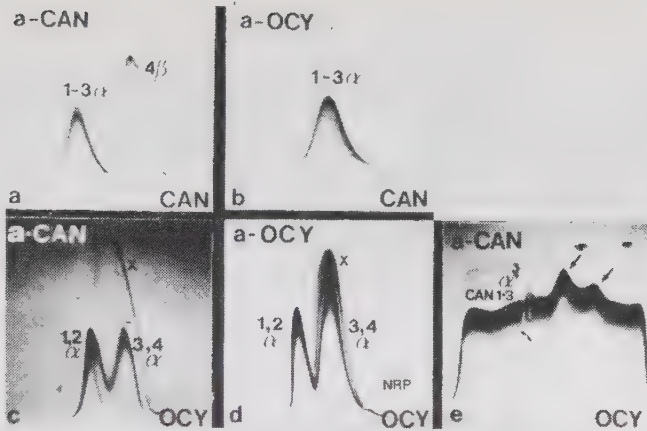


Abbildung 22:

Immunologische Verwandtschaft der Hämocyanin-Untereinheiten von OCYPODE und CANCER:

(a-e) Zweidimensionale IE's, die Anode der 1. Dim. war links; in (a,c,e) wurde anti-CANCER Antiserum (a-CAN) verwendet, in (b,d) anti-OCYPODE Antiserum (a-OCY). (a) Dissoziiertes CANCER-Hc gegen das homologe Antiserum; (b) CANCER-Hc Dissoziiert gegen das heterologe Antiserum: nur die Untereinheiten 1-3 werden erkannt; (c,d) bei dissoziiertem OCYPODE-Hc werden vom homologen anti-OCYPODE Antiserum (d), aber auch vom heterologen anti-CANCER Antiserum (c), sämtliche Hc-Komponenten präzipitiert; X = denaturiertes Protein; das NRP reagiert nur mit dem homologen Antiserum; (e) crossed-Line IE, entspricht (c) mit CANCER 1-3 in der Line: CANCER 1-3 kreuzreagiert mit OCYPODE-Hc-Monomeren; Pfeile: herausgehobenes OCYPODE-Hc.

4. Korrelation zwischen HOMARUS-, ASTACUS- und CANCER-Hämocyanin

Beide Vertreter der Astacura besitzen Hämocyanine, die aus je drei immunologisch deutlich verschiedenen Komponenten zusammengesetzt sind (Abb. 23a,d). In der zweidimensionalen Immunelektrophorese präzipitierte anti-ASTACUS Antiserum alle drei immunologisch distinkten Komponenten von HOMARUS und umgekehrt (Abb. 23b,c). Auffallend war, daß die schon vorher beobachtete partielle Identität zwischen ASTACUS 2 und ASTACUS 3/4/5 mit anti-HOMARUS Antiserum deutlicher zutage tritt (Abb. 23b; ASTACUS Dimer 5 ist hier nicht enthalten und wurde aufgrund seiner immunologischen Verwandtschaft mit 3/4 (vgl. S. 22) mit einbezogen). Im folgenden wurden neben den Antiseren gegen das Gesamt-Hämocyanin auch Untereinheiten-spezifische Antiseren eingesetzt.

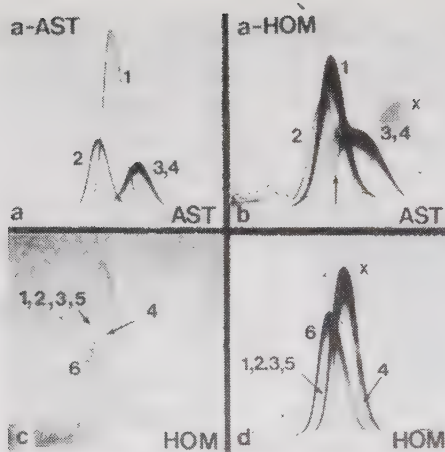


Abbildung 23:

Immunologische Verwandtschaft zwischen ASTACUS- und HOMARUS-Hämocyanin:

(a-d) Zweidimensionale IE's; die Anode der 1. Dim. war links; (a,c) anti-ASTACUS Antiserum; (b,d) anti-HOMARUS Antiserum; (a,b) Monomerenfraktion aus ASTACUS-Hc; (c,d) dissoziiertes HOMARUS-Hc. (a) ASTACUS-Hc gegen das homologe Antiserum und (b) gegen das heterologe Antiserum; (d) HOMARUS-Hc gegen anti-HOMARUS und (c) gegen anti-ASTACUS; alle drei immunologischen Komponenten der beiden Hc's werden vom jeweils heterologen Antiserum präzipitiert; (b,d) Pfeil: Kreuzreaktion zwischen ASTACUS 2 und 3/4; X = denaturiertes Hc.

Eine umfangreiche Serie von Tandem-crossed, crossed-Line und Rocket Immunelektrophoresen zum Vergleich der isolierten Untereinheiten miteinander und mit den Gesamtdissoziaten (Abb. 24 zeigt eine Auswahl) führte zu folgender Zuordnung:

ASTACUS 1 und HOMARUS 6 sind einander homolog und zeigen keine Kreuzreaktionen mit anderen Untereinheiten (Abb. 24d,h,i,m).

HOMARUS 4 reagierte besonders stark mit dem Dimer ASTACUS 5 (Abb. 24a,b,c) sowie mit den Monomeren 3 und 4 (Abb. 24e,k), jedoch auch (schwächer) mit ASTACUS 2 (Abb. 24e,f,l). Dies war angesichts der oben beschriebenen Kreuzreaktion zwischen ASTACUS 2 und ASTACUS 3/4/5 nicht unerwartet. Umgekehrt kreuzreagierte HOMARUS 1/2/3/5 zwar mit ASTACUS 2 (Abb. 24g), zeigte aber auch mit ASTACUS 3/4/5 eine schwache Immunreaktion (Abb. 24e). Insgesamt ergaben die Versuche, daß ASTACUS 2 stärker mit HOMARUS 1/2/3/5 korreliert ist und Astacus 3/4/5 stärker mit HOMARUS 4.

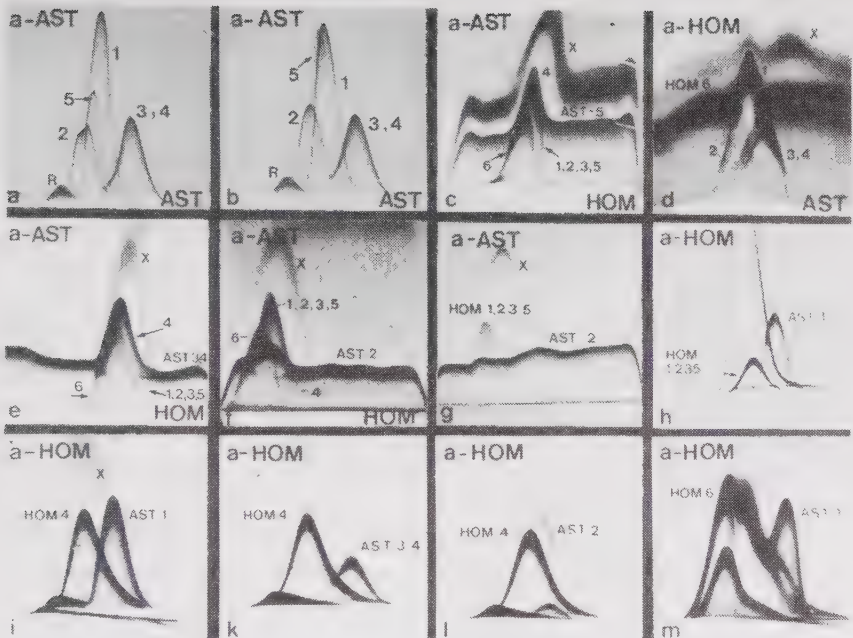


Abbildung 24:

Immunologische Verwandtschaft zwischen ASTACUS- und HOMARUS-Hämocyanin:

(a-m) Zweidimensionale IE's; die Anode der 1. Dim. war links. (a,b) Dissoziiertes ASTACUS-Hc gegen anti-ASTACUS Antiserum; R = undissoziiertes Material; (b) crossed-Line IE mit HOMARUS 4 in der Line: die Line lief anodisch aus dem Gel und ist daher nicht sichtbar, der ASTACUS 5-Gipfel wurde jedoch deutlich angehoben. (c,e,f) Crossed-Line IE's mit dissoziiertem HOMARUS-Hc gegen anti-ASTACUS Antiserum; X = denaturiertes Hc; (c) ASTACUS 5 in der Line reagiert selektiv mit HOMARUS 4; (e) ASTACUS 3/4 in der Line kreuzreagiert mit HOMARUS 4, aber auch schwach mit 1/2/3/5; (f) ASTACUS 2 in der Line reagiert mit HOMARUS 1/2/3/5 und schwächer mit HOMARUS 4. (d) Crossed-Line IE mit der Monomerfraktion aus ASTACUS-Hc gegen anti-HOMARUS Antiserum; HOMARUS 6 in der Line reagiert selektiv mit ASTACUS 1; X = denaturiertes Hc; (g) crossed-Line IE mit HOMARUS 1/2/3/5 gegen anti-ASTACUS Antiserum; die ASTACUS 2-Line kreuzreagiert mit HOMARUS 1/2/3/5; X = denaturiertes Hc. (h-m) Tandem-crossed IE's mit Untereinheiten aus ASTACUS- und HOMARUS-Hc gegen anti-HOMARUS Antiserum: (h,i,m) ASTACUS 1 kreuzreagiert nur mit HOMARUS 6 (m), nicht mit HOMARUS 4 (i) und 1/2/3/5 (h); (k) HOMARUS 4 ergibt eine starke Kreuzreaktion mit ASTACUS 3/4 und eine schwächere mit ASTACUS 2 (l).

Anti-CANCER Antiserum erkannte ASTACUS 3/4/5 und HOMARUS 4 relativ gut (Abb.25c,d). Das gleiche Ergebnis erzielte ich mit einem Antiserum spezifisch gegen die konservativen alpha-Untereinheiten CANCER 1/2/3 (Abb.25g). Im umgekehrten Fall erkannte anti-ASTACUS Hämocyanin Antiserum nur die konservativen CANCER-Untereinheiten 1/2/3 (Abb.25e). Die betreffenden Untereinheiten können somit als homolog betrachtet werden und erhielten auch bei den ASTACURA den Index alpha. Anti-CANCER 4 war nicht in der Lage, Untereinheiten der Astacura zu präzipitieren. CANCER 4 wurde weder von anti-ASTACUS noch von anti-HOMARUS Antiserum erkannt. Die variable beta-Untereinheit der Krabben-Hämocyanine steht nach wie vor isoliert. Es gab auch keinerlei Kreuzreaktionen zwischen CANCER-Hämocyanin und ASTACUS 1 bzw. HOMARUS 6. Damit ist allerdings noch kein Hinweis erbracht, daß diese Untereinheiten der variablen Komponente beta der Brachyuren entspricht. Ich halte es daher für angebracht, einen dritten Typ von Untereinheiten zu definieren, nämlich "gamma".

Kreuzreaktionen zeigten sich auch zwischen ASTACUS 2 bzw. HOMARUS 1/2/3/5 und CANCER 1/2/3 (Abb.25f,g). Diese Untereinheiten besitzen also ebenfalls alpha-typische Antigendeterminanten. Überwiegend liegen jedoch qualitativ andere Determinanten vor (vgl. Abb.25e mit Abb.25f). Dieser Monomerentyp wurde daher mit dem Index "delta" versehen. Die Komponenten alpha und delta sind immunologisch verwandt, während beta und gamma jeweils isoliert stehen. Beta variiert zudem noch interspezifisch stark. Die Hämocyanine der Astacura setzen sich demnach wie folgt zusammen: ASTACUS 3/4/5-alpha, 1-gamma, 2-delta und HOMARUS 4-alpha, 6-gamma, 1/2/3/5-delta.

5. Die Zuordnung der Langusten-Hämocyanine

Anti-PANULIRUS Antiserum reagierte überkreuz mit der 5S-Fraktion von PALINURUS (Abb.26a,b); umgekehrt präzipitierte anti-PALINURUS Antiserum das Hämocyanin von PANULIRUS in Form eines homogenen Gipfels, d.h. die 80K-Komponente trat nicht eigenständig zutage (Abb.26e,f). In einem crossed-Line Versuch mit dem Hämocyanin von PALINURUS in der Line gegen anti-PANULIRUS Antiserum verschmolz die Line vollständig mit dem anodischen Hämocyaningipfel von PANULIRUS; zwischen der Line und der 80K-Komponente war

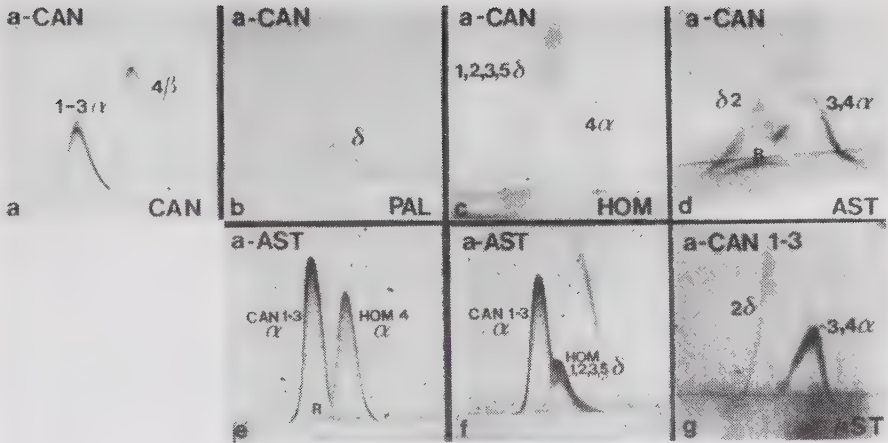


Abbildung 25:

Immunologische Verwandtschaft der Hämocyane aus CANCER, PALINURUS, ASTACUS und HOMARUS:

(a-g) Zweidimensionale IE's, die Anode der 1. Dim. war links. In (a-d,g) wurde anti-CANCER Antiserum verwendet, in (e,f) anti-ASTACUS Antiserum. (a) Dissoziiertes CANCER-Hc gegen das homologe Antiserum = Referenzmuster; (b) PALINURUS-Hc Dissoziat wird von anti-CANCER als ein homogener Gipfel erkannt; (c) bei HOMARUS-Hc werden nur die Untereinheiten 4 und 1/2/3/5 präzipitiert, wobei 1/2/3/5 defizient zu 4 wirken; (d,g) aus dem ASTACUS-Hc Monomerenmischung werden nur die Untereinheiten 2 und 3/4 erkannt, wobei das Präzipitat bei 3/4 kräftiger ist; (g) anti-CANCER 1-3 liefert das gleiche Ergebnis wie das Antiserum gegen sämtliche CANCER-Untereinheiten. (e,f) Tandem-crossed IE's mit CANCER- und HOMARUS-Hc-Monomeren gegen anti-ASTACUS Antiserum: (e) CANCER 1-3 ist sehr nahe verwandt mit HOMARUS 4, mit HOMARUS 1/2/3/5 besteht eine partielle Identität (f).

dagegen nur eine sehr schwache Reaktion zu erkennen (Abb.26g). Das Hämocyanin der europäischen Languste PALINURUS entspricht demnach den 94K/90K-Untereinheiten des Hämocyanins der amerikanischen Languste PANULIRUS, während die 80K-Komponente von PANULIRUS immunologisch abseits steht und bei PALINURUS fehlt. Dissoziiertes Hämocyanin aus PALINURUS wurde von anti-ASTACUS und anti-HOMARUS Antiserum präzipitiert (Abb.26c,d,h,i) sowie schwächer von anti-CANCER Antiserum (Abb.25b,26k). Es besteht eine klare Korrelation zwischen den alpha-Untereinheiten der drei Tiere. Kreuzreaktionen ergaben sich auch mit den delta-Komponenten der Astacura (Abb.26h).

Mit den gamma-Untereinheiten der ASTACURA und der beta-Komponente CANCER 4 konnte dagegen keine immunologische Verwandtschaft festgestellt werden.

Ein interessantes Ergebnis brachte eine Tandem-crossed Immunelektrophorese von Cancer 1/2/3 und PALINURUS-Hämocyanin gegen anti-ASTACUS Antiserum: Das Langusten-Hämocyanin reagierte dabei immunologisch defizient gegenüber den Krabben-Untereinheiten (Abb.26c).

Lamy et al. (1981a) berichten, daß die 80K-Einheit von PANULIRUS immunologisch verwandt ist mit Komponente M1 von CHERAX DESTRUCTOR, während über Reaktionen zwischen CHERAX-Hämocyanin und den Untereinheiten 94K/90K nichts erwähnt wird. Vermutlich wurden hier keine Präzipitate erhalten.

Nach Jeffrey et al. (1981) kreuzreagiert M1 mit der dimeren Untereinheit M'3 von CHERAX. Sollten die Dimeren der beiden Flußkrebse homolog sein, wofür alle bisher vorliegenden Strukturdaten sprechen, so müßte die 80K-Untereinheit deutlichere alpha-Eigenschaften zeigen, als die übrigen Hämocyanin-Untereinheiten der Langusten. In einem Rocket-Experiment wurden das 80K-Monomer sowie das Gemisch aller PANULIRUS-Untereinheiten bezüglich ihrer Reaktivität mit einem anti-ASTACUS Antiserum verglichen (Abb. 26i). Die Immunantwort war im Fall der 80K-Komponente eindeutig stärker als bei den 90K/94K-Untereinheiten.

Die 80K-Untereinheit aus PANULIRUS scheint somit zu den alpha-Komponenten zu gehören, PANULIRUS 90K/94K zu den partiell mit alpha-Untereinheiten verwandten delta-Typen. PALINURUS-Hämocyanin enthält aufgrund dieser Befunde also nur delta-Untereinheiten.

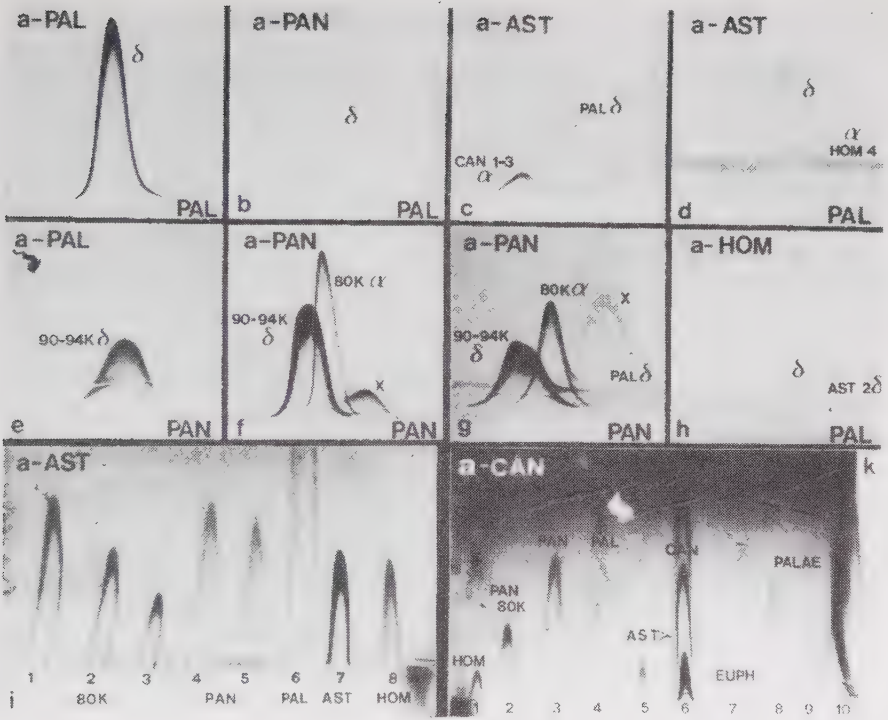


Abbildung 26:

Immunologische Verwandtschaft der Hämocyanine aus Palinuren, Astacuren und Brachyuren:

(a-h) Zweidimensionale IE's; die Anode der 1. Dim. war links. (a,b,e,f) Überkreuzvergleich der Hc's von PALINURUS und PANULIRUS; X = denaturiertes Hc; (a,c) anti-PALINURUS Antiserum; (b,f) anti-PANULIRUS Antiserum; (a,b) dissoziiertes PALINURUS-Hc; (e,f) PANULIRUS-Hc Dissoziat; (a,f) Referenzmuster beider Hc's gegen das jeweils homologe Antiserum; (b) PALINURUS-Hc wird vom heterologen Antiserum als ein homogener Gipfel präzipitiert; (e) anti-PALINURUS erkennt von PANULIRUS-Hc nur den 90-94K Gipfel. (g) Crossed-Line IE identisch mit (f) aber mit PALINURUS-Hc Dissoziat in der Line: die Line reagiert stark mit PANULIRUS 90-94K und nur schwach mit PANULIRUS 80K. (c) Tandem-crossed IE mit CANCER 1-3 und PALINURUS gegen anti-ASTACUS Antiserum: PALINURUS erscheint immunologisch defizient. (d,h) Crossed-Line IE's: PALINURUS reagiert sowohl mit HOMARUS 4 als auch mit ASTACUS 2 überkreuz. (i,k) Rocket-IE's gegen anti-ASTACUS und anti-CANCER Antiserum.

6. Die Einordnung der Hämocyane der Anomura

Die Hämocyane aus PAGURUS BERNHARDUS und GALATHEA SQUAMOSA bestehen beide wie beschrieben aus einer immunologisch homogenen Fraktion von Untereinheiten. Mit dem Antiserum gegen das Hämocyanin des anderen Tieres ergab sich jeweils eine starke Präzipitation (Abb.27c,d); diese Hämocyane sind sich also immunologisch sehr ähnlich.

In den Kreuzexperimenten mit den anderen Hämocyaninen wurde jeweils nur einer der beiden kathodischen Immunogipfel des GALATHEA-Hämocyanins von heterologen Antiseren erkannt (Abb.27d,f). Rocket-Immunelektrophoresen mit anti-Anomura Antiseren gegen die isolierten Untereinheiten der anderen Krebse zeigten starke Kreuzreaktionen. Z.B. erkannte anti-GALATHEA Antiserum die Untereinheiten 1/2/3 von CANCER (Abb.27g). Demnach sind die Hämocyane der Anomura mit den alpha-Komponenten verwandt.

Die Kreuzreaktionen mit den delta-Untereinheiten der Astacura dürften nicht nur auf diese Verwandtschaft zurückgehen, da anti-GALATHEA Antiserum ASTACUS alpha und delta nahezu gleich gut erkannte (Abb.27g).

Überraschenderweise ergab sich auch eine klare Erkennung der Astacura-Untereinheiten vom gamma-Typ (Abb.27g,h). Determinanten vom Typ alpha, delta und gamma, die bei den Astacura auf drei distinkte Untereinheiten verteilt sind, treten also bei den Hämocyaninen der Anomura gemeinsam auf einer einzigen Polypeptidkette auf.

Cancer beta stand wiederum abseits und wurde nicht erkannt.

7. Zuordnung des Hämocyanins aus der Garnele PALAEMON

Die bisher in das immunologische Verwandtschaftsschema eingegliederten Hämocyane entstammen Krebsen aus der dekapoden Unterordnung Reptantia, während PALAEMON die Unterordnung Natantia repräsentiert.

Anti-PALAEMON Antiserum erkannte die alpha- und delta-Komponenten der Astacura, die von diesem distanzierten Antiserum aus betrachtet, stark miteinander kreuzreagierten (Abb.28c,f-k). Die gamma-Komponente wurde von anti-PALAEMON Antiserum weder bei ASTACUS

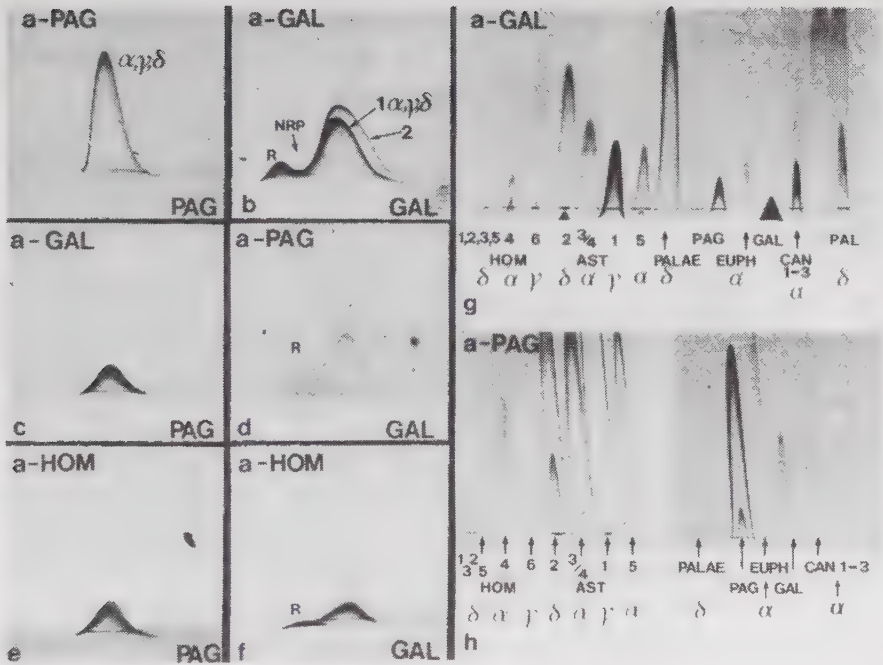


Abbildung 27:

Immunologische Einordnung der Hämocyane aus PAGURUS und GALATHEA:

(a-f) Zweidimensionale IE, die Anode der 1. Dim. befand sich links. (a,b) Referenzmuster von PAGURUS- und GALATHEA-Hc gegen das jeweils homologe Antiserum (R = undissoziierter Hc-Anteil, X = NRP); (c) PAGURUS-Hc gegen Anti-GALATHEA, (d) GALATHEA-Hc gegen anti-PAGURUS; (e,f) PAGURUS- bzw. GALATHEA-Hc gegen anti-HOMARUS Antiserum. Bemerkenswert ist, daß von den Gipfeln 1 und 2 des GALATHEA-Hc Immunomusters (b) von den heterologen Antiseren nur Gipfel 1 präzipitiert wird; Gipfel 2 stellt vermutlich denaturiertes Hc dar (in hier nicht gezeigten IE's war Gipfel 2 oft diffuser und weiter in Richtung Kathode gewandert, so daß er sich deutlicher als Denaturierungsartefakt zu erkennen gab; vgl. auch Abb. 19, S. 50). (g,h) Rocket IE's mit den Hc-Untereinheiten aus HOMARUS, ASTACUS, CANCER, PALINURUS, PALAEMON, EUPHAUSIA, GALATHEA und PAGURUS gegen anti-GALATHEA und anti-PAGURUS Antiserum: auffallend ist die Kreuzreaktion mit ASTACUS 1 und HOMARUS 6, die bei anti-GALATHEA Antiserum sehr stark und bei anti-PAGURUS Antiserum etwas schwächer war.

noch bei HOMARUS erkannt. Die beiden immunologisch distinkten Untereinheiten-Typen von PALAEMON (die Monomere 1/2/3 bzw. 4/5) erscheinen bei Verwendung von anti-ASTACUS sowie anti-HOMARUS Antiserum als partiell identisch (Abb.28b), obwohl sie gegenüber anti-PALAEMON Antiserum als nicht verwandt wirken (Abb.28a). PALAEMON 1/2/3 zeigte die stärkere Kreuzreaktion sowohl mit HOMARUS 1/2/3/5 als auch mit ASTACUS 2, also mit den delta-Untereinheiten der Astacura. PALAEMON 4/5 reagierte stärker mit HOMARUS 4 sowie ASTACUS 3/4/5 (Abb.28e), welche die alpha-Untereinheiten repräsentieren.

Die anti-Anomura Antiseren erkannten beide Untereinheitentypen von PALAEMON (Abb.27g,h; hier ist nur die Kreuzreaktion mit PALAEMON 1-3 gezeigt), und anti-PALAEMON Antiserum präzipitierte sowohl CANCER alpha (Abb.28d) als auch GALATHEA- und PAGURUS-Hämocyanin (Abb.28l). Anti-PANULIRUS Antiserum präzipitierte PALAEMON 1-3 wie auch 4/5 (Abb.28m).

Die intraspezifisch klar zutage tretenden immunologischen Unterschiede zwischen den Komponenten von PALAEMON verwischten sich bei den Experimenten mit anti-Reptantier Antiseren weitgehend, was die Verwandtschaft zwischen alpha- und delta-Ketten bzw. Determinanten besonders deutlich demonstrierte.

Die Untereinheiten des Hämocyanins aus PALAEMON lassen sich nach diesen Befunden wie folgt darstellen: 4/5-alpha, 1/2/3-delta.

8. Die Stellung des Hämocyanins aus dem Krill EUPHAUSIA SUPERBA

Mit Hilfe von Krill-Hämocyanin habe ich versucht, die Verwandtschaftsverhältnisse aus phylogenetisch noch distanzierterer Sicht zu betrachten. Krill ist wie erwähnt kein Dekapode, aber als Vertreter der Euphausiacea nahe mit diesen verwandt.

Immunochemische Experimente mit der immunologisch einheitlichen 5S-Fraktion aus Krill ergaben keine Kreuzreaktion mit den Hämocyanin-Untereinheiten der Dekapoden.

Nach Reichlin et al. (1970) wirken Proteinoligomere u.U. stärker antigen, als die konstituierenden Monomere. Dies zeigte sich beim Hämocyanin der Vogelspinne ganz deutlich (Markl et al., 1980) und wurde von Lamy et al. (1981a) für das Hämocyanin aus PANULIRUS INTERRUPTUS bestätigt. Ich setzte daher für die folgenden Versuche das native Hexamer ein.

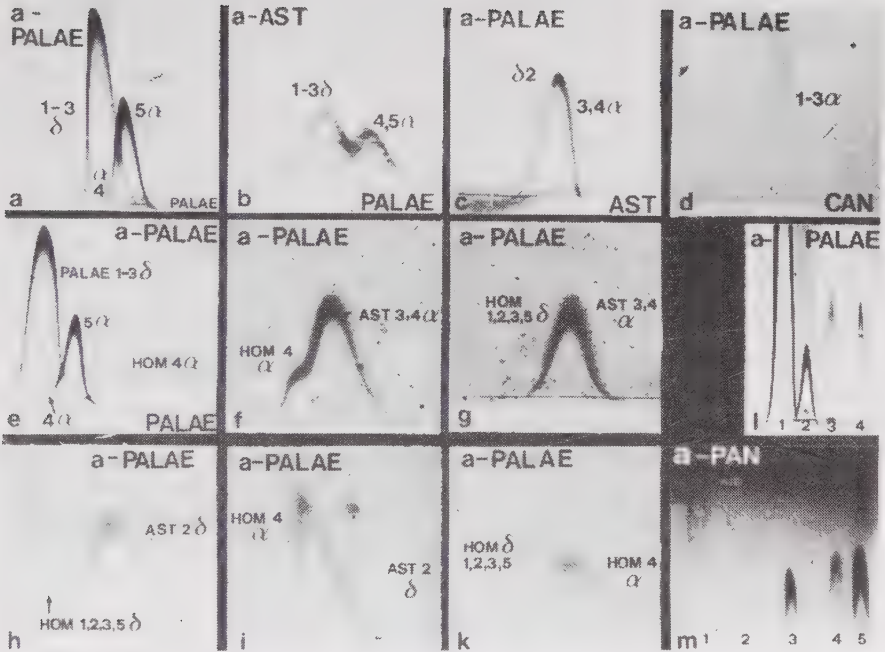


Abbildung 28:

Immunologische Einordnung des Hämocyansins aus PALAEMON:

(a-k) Zweidimensionale IE's, die Anode bei der 1. Dim. war links. (a) PALAEMON-Hc gegen anti-PALAEMON Antiserum (Referenzmuster); (b) PALAEMON-Hc gegen anti-ASTACUS Antiserum: PALAEMON 1-3 und 4/5 erscheinen partiell identisch. In (c-k) wurde durchwegs anti-PALAEMON Antiserum eingesetzt. (c) ASTACUS-Hc-Monomerengemisch gegen anti-PALAEMON: ASTACUS 2 erscheint defizient zu 3/4, 1 wird nicht erkannt; (d) aus dem CANCER-Hc Dissoziat werden nur die Monomere 1-3 präzipitiert; (e) crossed-Line IE identisch mit (a) jedoch mit HOMARUS 4 in der Line: die Line wird von PALAEMON 4,5 unterbrochen, nicht aber von 1-3. (e-k) Tandem-crossed IE's mit den delta- und alpha-Untereinheiten von ASTACUS und HOMARUS gegen anti-PALAEMON Antiserum: HOMARUS 4 und ASTACUS 3/4 wirken eng verwandt (f), ebenso HOMARUS 1/2/3/5 und ASTACUS 2 (h); die delta-Untereinheiten erscheinen jedoch partiell identisch mit den alpha-Monomeren (g,i,k). (l) Rocket IE mit PALAEMON 1-3 (1), 4/5 (2), PAGURUS- (3) und GALATHEA-Hc (4) gegen anti-PALAEMON Antiserum. (m) Rocket IE mit PALINURUS- (1), EUPHAUSIA- (2) und PALAEMON-Hc (5) sowie PALAEMON 1-3 (3) und 4/5 (4) gegen anti-PANULIRUS Antiserum. Die Rocket IE's demonstrieren die immunologische Verwandtschaft zwischen PALAEMON- und den Anomuren-Hc's sowie zwischen PALAEMON- und Langusten-Hc's.

In der zweidimensionalen Immunelektrophorese ergaben sich starke Kreuzreaktionen mit den Untereinheiten PALAEMON 4/5 (Abb.29k), ASTACUS 3/4/5 (Abb.29b,c,f,g), HOMARUS 4 (Abb.29d) und CANCER 1/2/3 (Abb.29a), also mit den Komponenten vom alpha-Typ.

Reaktionen gab es auch mit den Antiseren gegen die Hämocyane aus PAGURUS und GALATHEA (Abb.27g,h), während das Hämocyanin aus PALINURUS nicht präzipitiert wurde. Allerdings wurde das 16S-Hämocyanin von EUPHAUSIA durch anti-PANULIRUS Antiserum präzipitiert (Abb.28m). Versuche mit der isolierten 80K-Untereinheit aus PANULIRUS-Hämocyanin stehen aus, diese scheint jedoch als alpha-Untereinheit für die Präzipitatbildung verantwortlich zu sein, wogegen das Fehlen einer direkten Kreuzreaktion mit PALINURUS-Hämocyanin (delta) die Unterschiede zwischen alpha- und delta-Ketten unterstreicht.

Mit den delta-Untereinheiten von ASTACUS, HOMARUS und PALAEMON waren nur schwache oder keine Kreuzreaktionen feststellbar (Abb. 29e,h,i); mit den gamma-Untereinheiten gab es keine Reaktion, ebenso wenig mit der beta-Komponente aus Krabben-Hämocyanin. Das Krill-Hämocyanin kreuzreagierte somit nahezu selektiv mit der Untereinheit alpha. Dieser Hämocyanin-Baustein stellt damit vermutlich den phylogenetisch ältesten und konservativsten Untereinheitentyp der Dekapoden-Hämocyane dar.

9. Kreuzreaktionen mit Hämocyaninen aus Cheliceraten

Der immunologische Nachweis einer Verwandtschaft zwischen den Hämocyanin-Untereinheiten aus Crustaceen und Cheliceraten ist bisher gelungen an mit Harnstoff denaturiertem Protein, und zwar zwischen der Languste PANULIRUS INTERRUPTUS und dem Skorpion ANDROCTONUS AUSTRALIS. Anti-UCA PUGNAX Antiserum sowie anti-PENAEUS SETIFERUS Antiserum präzipitierten das native Hämocyanin-Oligomer (24-mer, 35S) des Skorpions (Lamy et al., 1981a). Durch Immunoabsorption wurden gemeinsame Antigen-Determinanten bei den Untereinheiten V,VI und IIa von LIMULUS-Hämocyanin und vier Hämocyaninen aus Crustaceen nachgewiesen (Lamy, 1983). Eigene immunelektrophoretische Experimente mit den Untereinheiten von Hämocyaninen beider Tiergruppen führten zu einem negativen Ergebnis. Rocket Immunelektrophorese der undissoziierten Oligomere der Krebse ASTACUS, HOMARUS, PALINURUS, PANULIRUS, CANCER

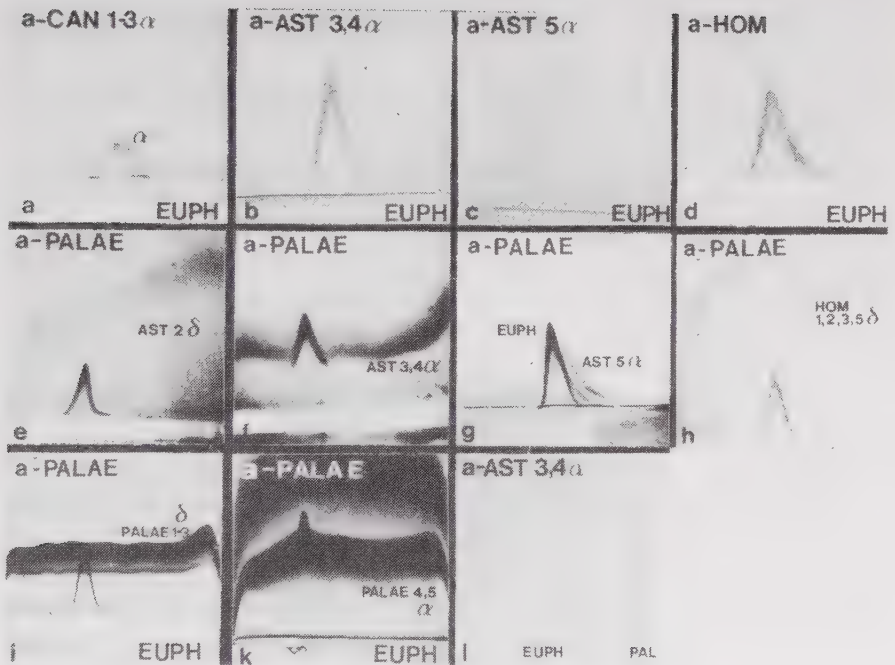


Abbildung 29:

Immunologische Einordnung des Hämocyanins aus EUPHAUSIA: (a-k) Zweidimensionale IE's, die Anode der 1. Dim. war links. In allen Fällen wurde undissoziiertes EUPHAUSIA-16S-Hc verwendet. (a-d) EUPHAUSIA-Hc wird von den Antiseren gegen CANCER 1-3, ASTACUS 3/4, ASTACUS 5 und HOMARUS 4 erkannt. (e,f,h-k) Crossed-Line IE's mit EUPHAUSIA-Hc gegen anti-PALAEMON Antiserum; (e) ASTACUS 2 in der Line: keine Kreuzreaktion; (f) ASTACUS 3/4 in der Line: starke Kreuzreaktion; (h) keine Reaktion mit HOMARUS 1/2/3/5; (i) keine Reaktion mit PALAEMON 1-3; (k) PALAEMON 4/5 in der Line kreuzreagiert stark mit dem EUPHAUSIA-Hc; (g) Tandem-crossed IE mit EUPHAUSIA-Hc und ASTACUS 5: ASTACUS 5 ist demnach immunologisch defizient gegenüber Krill-Hc; (l) Rocket IE mit EUPHAUSIA-Hc und PALINURUS-Hc gegen anti-ASTACUS 3/4 Antiserum. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde bereits 1982 beim EMBO-Symposium in Leeds vorgetragen (Markl et al., 1983; Bridges et al., 1983).

und EUPHAUSIA sowie der Cheliceraten ANDROCTONUS, LIMULUS und EURYPELMA verliefen ebenfalls zumeist negativ. Lediglich in einem Fall gab es ein klares Ergebnis:

Ein anti-EURYPELMA Antiserum mit einem extrem hohen Antikörpertiter präzipitierte das Hämocyanin aus Krill (Abb.30). Da Krill-Hämocyanin ausschließlich aus alpha-Monomeren aufgebaut ist, scheinen die alpha-Determinanten zur Basisausstattung der Arthropodenhämocyane zu gehören.

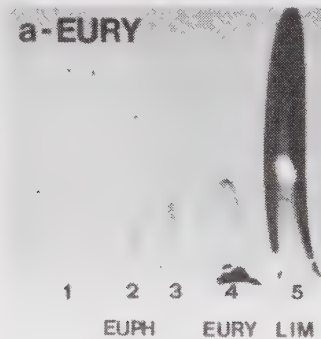


Abbildung 30:

Immunologische Verwandtschaft der Hämocyane aus Cheliceraten und Crustaceen:

Rocket IE mit EUPHAUSIA-16S-Hc (1,2,3), EURYPELMA 37S-Hc (4) und LIMULUS 60S-Hc (5) gegen anti-EURYPELMA Antiserum: Krill-Hc kreuzreagiert eindeutig mit dem Vogelspinnen-Hc.

C) DIE QUARTÄRSTRUKTUR DER DODEKAMEREN HÄMOCYANINE AUS ASTACUS, HOMARUS UND CANCER

1. Bisherige Befunde

Bei den Hämocyaninen der Cheliceraten übernehmen immunologisch distinkte Untereinheiten spezifische architektonische Aufgaben bei der Konstruktion der Quartärstruktur (Markl, 1980; Lamy et al., 1981b; 1983a; Sizaret et al., 1982; Markl et al., 1981a). Markl et al. (1979b) sowie Markl und Kempster (1981a) fanden, daß auch bei Crustaceen-Hämocyaninen die Anzahl verschiedener Untereinheiten mit wachsender Komplexität der Quartärstruktur zunimmt. Ein Modell des dodekameren Hämocyanins des Flußkrebsses *CHERAX DESTRUCTOR* stammt von Jeffrey (1979). In diesem Modell stehen die beiden hexameren Halbstrukturen über drei Untereinheiten auf beiden Seiten miteinander in Verbindung, wobei zwei Untereinheiten durch eine Disulfidbrücke verknüpft sind.

Elektronenmikroskopischen Auswertungen zufolge ist eine Verknüpfung über vier Kontaktflächen bei den dodekameren Halbstrukturen der 37S-Hämocyanine der Cheliceraten wahrscheinlich, je drei Untereinheiten pro Hexamer sind daran beteiligt (Lamy et al., 1981b; Bijlholt et al., 1982). Ansonsten ist für dodekamere Hämocyanine jedoch eine Verbindung der hexameren Halbstrukturen durch je eine Untereinheit pro Hexamer anzunehmen, die miteinander einen annähernd punktförmigen Kontakt eingehen, z.B. bei der Spinne *CUPIENNIUS SALEI* (Markl, 1980) sowie bei den Krebsen *LIGIA EXOTICA*, *SQUILLA MANTIS*, *HOMARUS AMERICANUS*, *ASTACUS LEPTODACTYLUS* und *CANCER PAGURUS* (van Bruggen et al., 1981; van Bruggen, 1983).

Die Beteiligung von Disulfidbrücken am Inter-Hexamer-Kontakt kann außer für *CHERAX* noch für *ASTACUS* angenommen werden (Markl et al., 1979b; Pilz et al., 1980; Markl und Kempster, 1981b) und wurde für *CUPIENNIUS* definitiv nachgewiesen (Markl, 1980), während bei *HOMARUS* und *CANCER* Disulfidbrücken zwischen Untereinheiten fehlen (Markl et al., 1979b).

Röntgenstrukturdaten über den Aufbau des hexameren Grundbausteins (16S) wurden bisher nur am Hämocyanin der Languste *PANULIRUS INTERRUPTUS* gewonnen. Demnach sind die 6 Untereinheiten in

zwei koplanaren, übereinanderliegenden und um 60 Grad gegeneinander verdrehten Trimeren angeordnet (Abb.42; dort entspricht das Hexamer der Halbstruktur des abgebildeten 24S-Hämocyanin-Modells). Senkrecht zur Ebene der Trimeren läßt sich eine dreizählige Symmetrieachse durch das Hexamer legen. Die Gesamtstruktur entspricht einem trigonalen Antiprisma (van Schaick et al., 1981; Gaykema et al., 1983a,b). Die Orientierung zweier Hexamere im Dodekamer ist bei *CANCER*, *ASTACUS* und *HOMARUS* gleichartig; die trigonalen Symmetrieachsen der beiden Hexamere stehen dabei, wie Abb.42 zeigt, senkrecht aufeinander und senkrecht zur der Molekülachse (van Bruggen et al., 1981; van Bruggen, 1983).

Die 37S-Hämocyanine der Cheliceraten lassen sich in hoher Ausbeute aus ihren Untereinheiten reassoziieren, wenn alle Monomertypen zugegen sind (z.B. Decker et al., 1980). Die Rekonstitution des 24S-Hämocyanins der Spinne *CUPIENNIUS* verläuft ebenfalls annähernd quantitativ (Markl und Kempter, 1981b; Markl, 1980). Dagegen endeten Versuche, die Dodekamere von Crustaceen-Hämocyaninen aus den Untereinheiten zu rekonstituieren, bisher in den meisten Fällen beim Hexamer. Dies gilt insbesondere für die Hämocyanine aus Krabben (di Giamberardino, 1967; Ellerton et al., 1970; Carpenter und van Holde, 1973; Hamlin und Fish, 1977; Rochu and Fine, 1980; Herskovits et al., 1981; Markl und Kempter, 1981b), aber auch für Isopoden der Gattung *LIGIA* (Terwilliger et al., 1979; Terwilliger, 1982). Eine Übersicht geben Ellerton et al. (1983). Jeffrey et al. (1978) erzielten eine Ausbeute von bis zu 20% an reassozierten Dodekameren beim Hämocyanin aus *CHERAX*. Dagegen existiert bei *HOMARUS AMERICANUS* ein reversibles Gleichgewicht zwischen Hexamer und Dodekamer, wobei die Gegenwart von Calcium (5 Calciumionen werden pro Dodekamer gebunden), ein neutrales Milieu (pH 7,5) und ein Absenken der Temperatur die Bildung des Dodekamers fördert (Morimoto und Kegeles, 1971; Tai und Kegeles, 1971). Ähnliches wurde im Falle des Hämocyanins aus dem Maulwurfskrebs *CALLIANASSA CALIFORNIENSIS* berichtet. Dabei handelt es sich um ein tetraedrisches 4-Hexamer, das unter natürlichen Bedingungen mit seiner hexameren Viertelstruktur im Gleichgewicht steht; dieses Gleichgewicht liegt bei niedriger Temperatur und/oder niedriger Magnesiumionenkonzentration auf der Seite des Hexamers (Roxby et al., 1974; Blair und van Holde,

1976; van Holde et al., 1977; Arisaka und van Holde, 1979). Nach der Dissoziation der Hexamere in Untereinheiten und anschließender Reassoziierung besitzen jedoch nicht sämtliche der entstandenen reassozierten 16S-Moleküle die Fähigkeit, sich zu Dodekameren zusammenzuschließen; dies gilt sowohl im Fall von HOMARUS (Pickett et al., 1966; Morimoto und Kegeles, 1971) als auch bei CALLIANASSA (Arisaka und Van Holde, 1979).

Im allgemeinen scheint der Aggregationszustand eines Hämocyanins durch seine Zusammensetzung aus Untereinheiten festgelegt zu sein und ist im physiologischen Medium höchstens durch Alterung veränderbar; letzteres wurde beim Hämocyanin aus CANCER beobachtet (Markl et al., 1979b).

2. Stöchiometrie der Untereinheiten in den Dodekameren

Um die stöchiometrische Zusammensetzung der 24S-Moleküle aus den in Kapitel A identifizierten Untereinheitentypen zu bestimmen, wurden folgende Verfahren angewandt:

- (1) Dissoziation der Hämocyanin-Dodekamere und planimetrische Bestimmung der Gipfflächen im Muster der zweidimensionalen Immunelektrophorese. Als Eichwert wurde ein Gemisch der Untereinheiten in bekannter Konzentration untersucht ("Immunoscanning").
- (2) Die Flächen unter den Gipfeln der Monomere im Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie (vgl.S.23, Abb.3 und S.39, Abb.12) wurden ebenfalls planimetrisch bestimmt. Zur Bestimmung des Anteils an ASTACUS Dimer 5 zog ich das Elutionsprofil der Gelchromatographie der Dissoziationsprodukte heran (vgl.S.21, Abb.2).

Versuche, die Stöchiometrie der Untereinheiten im HOMARUS 24S-Hämocyanin festzustellen, schlugen aus mehreren Gründen fehl: Das Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie konnte wegen des beträchtlichen Anteils reassoziierter Untereinheiten nicht ausgewertet werden. Untereinheit 6 war fast vollständig reassoziert (vgl.S.34, Abb.9). Zudem erwies sich Untereinheit 6 als besonders labil und denaturierte sehr leicht (vgl.S.33), was das Muster der zweidimensionalen Immunelektrophorese veränderte und bei der Planimetrie zu stark streuenden Werten führte. Eine photometrische Auswertung des Bandenmusters der nativen Elektrophorese konnte nicht durchgeführt werden, da die einzelnen

Proteinbanden zu dicht beieinander lagen (vgl. S.31, Abb.7i). Dagegen konnte die Untereinheitenverteilung in den 24S-Hämocyaninen aus ASTACUS und CANCER analysiert werden. Die Ergebnisse finden sich in Tab.1.

Tabelle 1:

Stöchiometrische Verteilung der einzelnen Untereinheiten in den 24S-Hämocyaninen aus CANCER und ASTACUS:
Der relative Anteil der Untereinheiten wurde durch planimetrische Auswertung von Mustern zweidimensionaler Immunelektrophoresen sowie der Elutionsprofile von Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration ermittelt. Die Fehlergrenzen geben die Minimal- und Maximalwerte aus insgesamt je vier Bestimmungen an. Das ASTACUS Dimer 5 (= UE5) wurde hier wie im folgenden als eine Untereinheit gezählt, demnach beträgt die Summe der Untereinheiten bei ASTACUS wie bei CANCER zwölf.

CANCER-Hc	UE1/2	:	UE3	:	UE4		Untereinheiten
	6	:	2	:	4		relativer Anteil
	(+/-0,5)		(+/-0,2)		(+/-0,4)		Fehlergrenzen
ASTACUS-Hc	UE1	:	UE2	:	UE3/4	:	UE5
	4	:	4	:	2	:	1
	(+/-0,2)		(+/-0,5)		(+/-0,2)		(+/-0,1)
							Fehlergrenzen

3. Gewinnung und Untersuchung von Dissoziationszwischenstufen

a) HOMARUS AMERICANUS 24S-Hämocyanin

HOMARUS 24S-Hämocyanin zerfällt bereits bei neutralem pH in 16S-Halb-moleküle, wenn Calciumionen aus dem Puffersystem entfernt werden (Morimoto und Kegeles, 1971) (Abb.31b,4). Bei niedriger Wasserstoffionenkonzentration (ab pH 8,8) dissoziieren diese Halb-moleküle weiter in Monomere. Im Elektrophoresesystem nach Laemmli (1970) (ohne Calciumionen; pH 8,8) ist das 24S-Molekül instabil und zerfällt in Hexamere und diese z.T. in Monomere (Abb.31b,4). Daß die hexamere Zwischenstufe bei der PAGE relativ

stabil bleibt, könnte daran liegen, daß zu ihrem Aufbau nicht wie beim Dodekamer Calciumionen vonnöten sind. Dies wurde zwar experimentell nicht nachgeprüft, bei der PAGE nach Laemmli (1970) sind aber jedenfalls keine Calciumionen zugegen und dennoch liegt ein beträchtlicher Anteil an Hämocyanin-Hexameren vor.

b) CANCER PAGURUS 24S-Hämocyanin

Die Dissoziation von CANCER-Hämocyanin wird ebenfalls durch eine Senkung der Wasserstoffionenkonzentration erreicht (Markl et al., 1979b; Rochu und Fine, 1980). Wie bei HOMARUS-Hämocyanin genügt bereits ein pH von 8,8 (0,05 M Tris/HCl-Puffer, 1 mM EDTA), um eine quantitative Dissoziation zu erzielen. Trägt man undissoziiertes CANCER 24S-Hämocyanin auf ein alkalisches Elektrophorese-Gel nach Laemmli (1970) auf, so zerfällt der überwiegende Anteil des Materials in Hexamere und Monomere (Abb.31b,1); wie bei HOMARUS-Hämocyanin wird bei der Dissoziation eine hexamere Zwischenstufe durchlaufen.

c) ASTACUS LEPTODACTYLUS 24S-Hämocyanin

Das elektrophoretische Bandenmuster von ASTACUS-Hämocyanin nach 6 Stunden Dialyse gegen pH 9,6 (Glycin/NaOH-Puffer, I = 0.05, 10 mM EDTA) wies vier Proteinbanden im Bereich von Oligomeren auf (Abb.31a;b,3). Bei der am weitesten kathodisch wandernden, starken Bande handelt es sich um noch undissoziiertes Dodekamer. Einige sehr schwache Banden oberhalb des Dodekamers gehen wahrscheinlich auf höher aggregiertes Hämocyanin wie z.B die von Gondko und Michalak (1981) beschriebene 29S-Komponente zurück.

Das nach Markl et al. (1979b) aus den Untereinheiten 1 und 2 bestehende native 16S-Hämocyanin war elektrophoretisch heterogen: Es ließ sich in mindestens 5 verschiedene Oligomere auftrennen (Abb.31a,1).

Zwischen Hexamer und Dodekamer wanderten in der nativen Elektrophorese zwei weitere Proteinbanden (Abb.31a;b,3). Sie konnten durch Gelfiltration (S.20) in geringer Konzentration rein isoliert werden und sedimentierten in der analytischen Ultrazentri-

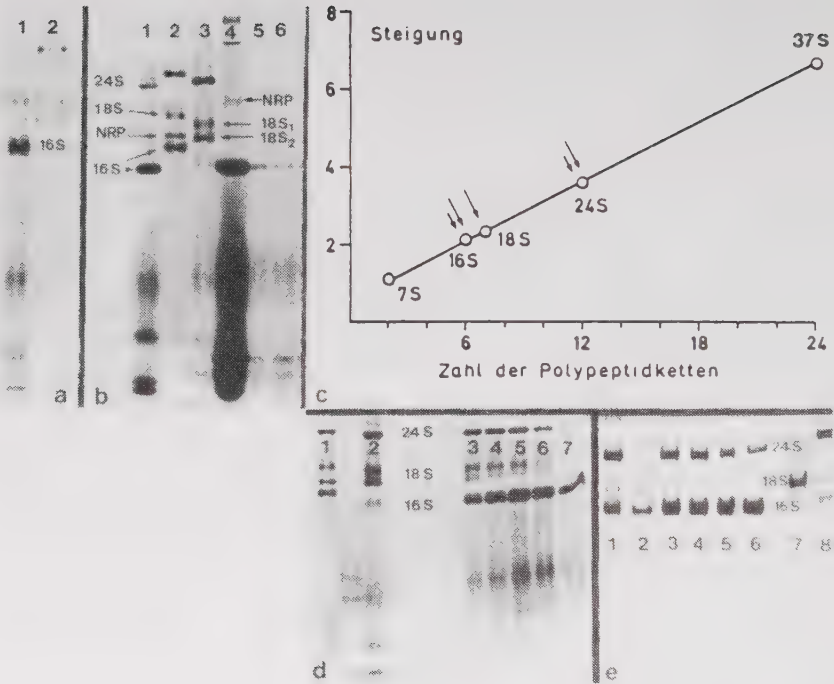


Abbildung 31:

Dissoziationsverhalten der Hämocyanine aus ASTACUS, HOMARUS und CANCER:

(a,b,d,e) Analytische PAGE der nativen Hc's; 5-10% Gel; Anode unten; (a,b,d) System nach Laemmli (1970) bei pH 8,8; (a) 1 = ASTACUS 16S-Hc als Hauptkomponente neben 18S- (zwei Banden) und 24S-Hc; das native 16S-Hc ist heterogen (5 Banden); 2 = teilweise in 18S-Hc zerfallenes 24S-Hc: hier fehlt die 16S-Komponente; (b) die Hc's aus CANCER (= 1) und ASTACUS (= 3) nach 2 Stunden Dialyse gegen Dissoziationspuffer: CANCER 24S-Hc ist teilweise in Hexamere und Monomere zerfallen; ASTACUS 24S-Hc zerfiel partiell in die beiden 18S-Komponenten, Dimer und Monomere; die kleine Menge ASTACUS 16S-Hc ist kein Dissoziationsprodukt, sondern eine Verunreinigung des 24S-Ausgangsmaterials; 4 = HOMARUS-Hc Pellet: das 24S-Hc dissoziierte bei der PAGE in Hexamere und Monomere; kathodisch vom 16S-Hc drei NRP-Banden; 2 = 24S-Hc, 18S-Hc, 16S-Hc und NRP der Spinne CUPIENNIUS; 5 = 6 = Probe wie in 4 in geringerer Konzentration, daher ist das NRP nicht sichtbar. (d,e) Behandlung von ASTACUS-Hc mit β -Mercaptoäthanol; (d) 1 = CUPIENNIUS-Hc; 2 = unbehandeltes ASTACUS-Hc (zwischen 1 und 2: ASTACUS Dimer, verunreinigt mit Monomeren); 3-7 = bei 37 Grad/20 Min. mit 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0% und 4,0% β -Mercaptoäthanol inkubiertes ASTACUS-Hc: 24S- und 18S-Banden verschwinden, 16S-Bande wird stärker mit steigender β -Mercaptoäthanol-Konzentration; (e) β -Mercaptoäthanolspaltung in der neutralen PAGE Nr.6 (pH 7,5) nach Maurer (1968):

1 = 8 = unbehandeltes ASTACUS-Hc; 7 = isoliertes, unbehandeltes 18S-Hc: die beiden 18S-Komponenten erscheinen als eine Bande; 2 = 18S-Hc nach Inkubation mit β -Mercaptoäthanol, beachte die 16S-Bande; 3-6 = 24S-Hc nach Inkubation mit 1%, 2%, 3% und 4% β -Mercaptoäthanol. (c) Molekulargewichtsbestimmung nach Hedrick & Smith (1968) der Hc-Oligomere aus ASTACUS, HOMARUS und CANCER sowie ihrer Dissoziationszwischenstufen; Ordinate: Logarithmus der Laufstrecken der Proteinbanden in der nativen PAGE (pH 8,8) in Gelen verschiedener Porengröße (4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0% und 6,5% Acrylamid); Abszisse: Zahl der Untereinheiten; die Eichgerade wurde mit CUPHENNIUS 24S-, 18S- und 16S-Hc sowie dem CUPHENNIUS Dimer und EURYPELMA 37S-Hc erstellt (Ringe); lange Pfeile: ASTACUS-Hc; kurze Pfeile: CANCER- und HOMARUS-Hc.

Ultrazentrifuge mit 18S. Es zeigte sich, daß ASTACUS 24S-Hämocyanin bei der Dissoziation nicht über eine hexamere 16S-Zwischenstufe, sondern über diese 18S-Komponenten in Untereinheiten zerfällt.

Markl (1980) entdeckte beim 24S-Hämocyanin der Spinne CUPHENNIUS eine Dissoziationszwischenstufe, die mit 18S sedimentierte und im Elektronenmikroskop als Hexamer mit einer daran angelagerten siebten Untereinheit identifiziert wurde. Diese Heptamere setzten sich aus fünf Monomeren und einem S-S-Homodimer zusammen, wobei die Hälfte des Dimers aus der hexameren Struktur herausragte und mit reduzierenden Agenzien abgespalten werden konnte. Die Vermutung, daß die 18S-Aggregate aus ASTACUS ebenfalls Heptamere darstellen könnten, bestätigte sich nach Bestimmung der Zahl der Untereinheiten mit der Methode von Hedrick und Smith (1968). Gleichzeitig wurden dabei auch die 16S-Zwischenstufen aus CANCER und HOMARUS untersucht (Abb.31c). Beide 18S-Banden aus ASTACUS 24S-Hämocyanin enthalten demnach in Analogie zum CUPHENNIUS 18S-Molekül 7 Untereinheiten (Heptamere), die 16S-Zwischenstufen aus HOMARUS- und CANCER-Hämocyanin enthalten 6 Untereinheiten (Hexamere). Im neutralen Elektrophoresesystem Nr.6 nach Maurer (1968) bei pH 7,5 wird die 18S-Fraktion von ASTACUS-Hämocyanin nur durch eine einzige Proteinbande repräsentiert (Abb.31e,7). Die beiden Heptamere unterscheiden sich also offenbar nur hinsichtlich ihrer Ladung.

Bei Behandlung der 18S-Komponenten mit 5% (v/v) β -Mercaptoäthanol zerfallen diese in Hexamere (Abb.31d,3-7; 31e,2-6). Im Monomerbereich wurde jedoch keine neue Untereinheit gefunden. Das 24S-Molekül wurde unter den gleichen Bedingungen ebenfalls in

Hexamere gespalten (Abb.31d,3-7; 31e,3-6); dies stellten auch Pilz et al. (1980) fest.

Das S-S-Heterodimer (= Untereinheit 5) aus ASTACUS-Hämocyanin bildet nach diesen Befunden die Brücke zwischen den beiden hexameren Halbmolekülen des Dodekamers. Gestützt wird dies dadurch, daß nur ein Dimer im 24S-Molekül enthalten ist (s.o.). Da es sich bei ASTACUS um ein Heterodimer handelt (S.18) wird das Auftreten von zwei 18S-Banden unterschiedlicher Ladung verständlich: Je nach dem, welche Dimer-Hälfte aus dem Hexamer ragt liegt die eine oder die andere der beiden elektrophoretisch verschiedenen Formen vor.

Durch Reassoziationsexperimente und letztlich durch Immunelektromikroskopie versuchte ich im folgenden, die Vorstellung von der Brückenfunktion des ASTACUS-Dimers zu erhärten.

4. Reassoziationsexperimente

Die Kompetenz der einzelnen, immunologisch unterscheidbaren Untereinheiten beim Aufbau des 24S-Moleküls wurde durch Reassoziationsexperimente untersucht. Dazu dialysierte ich sowohl die isolierten Untereinheiten als auch alle möglichen Kombinationen von Untereinheiten sowie die ungetrennten Dissoziationsgemische der nativen Oligomere gegen neutrale Puffer. Die größten Ausbeuten an Reassoziaten erzielte ich bei Verwendung von 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, unter Zusatz von 10 mM Calciumchlorid. Der stabilisierende Einfluß zweiwertiger Kationen auf die Quartärstruktur ist bei den einzelnen Hämocyaninen unterschiedlich stark (Review: Van Holde und Miller, 1982). Höhere Calciumkonzentrationen als 10 mM oder der Zusatz von Magnesiumionen hatten bei ASTACUS-, HOMARUS- und CANCER-Hämocyanin keinen nachweisbaren Effekt. Die Dialysen wurden bei 4 Grad durchgeführt und das Ergebnis nach einer Woche elektrophoretisch, in der analytischen Ultrazentrifuge und in einigen Fällen elektronenmikroskopisch untersucht. Die Proteinkonzentration überstieg in keinem Fall 2 mg/ml. Höhere Konzentrationen führten zumindest beim Hämocyanin aus EURYPELMA zu Fehl ASSOZIATEN (Decker et al., 1980; Markl et al., 1982).

a) ASTACUS-Hämocyanin

Die native Elektrophorese bei pH 8,8 ist für die Beurteilung des Reassoziationsverhaltens nur bedingt geeignet, da bei diesem pH selbst das undissoziierte Hämocyanin teilweise in Untereinheiten zerfällt (Abb.32a, Probe R). Die Auflösung der Banden ist jedoch deutlich besser, als im neutralen Elektrophoresesystem Nr.6 nach Maurer (1968), weshalb zumindest bei ASTACUS-Hämocyanin die alkalische Elektrophorese vorgezogen wurde. Im allgemeinen ermöglichte erst die Kombination der Daten aus Sedimentationsläufen und Elektrophoresen eine befriedigende Beurteilung des Reassoziationsverhaltens.

Zur analytischen Ultrazentrifugation sei angemerkt, daß sie nur bei einem Gemisch weniger Komponenten gute Aussagen liefert. Bei einer gegebenen Drehzahl wird ein Gemisch aus Hämocyanin-Monomeren bis Dodekameren nur in einem bestimmten Molekulargewichtsbereich gut aufgelöst, so wirken hohe Drehzahlen (ca. 44000 UpM) nivellierend im Bereich von Hexameren und Dodekameren, wogegen Monomere und Dimere unter diesen Bedingungen gut getrennt werden. Der umgekehrte Fall trifft bei niedrigen Drehzahlen (ca. 30000 UpM) zu. Zudem können die Einzelkomponenten unter Umständen interagieren, assoziieren und dissoziieren.

Die Ergebnisse der Sedimentationsanalysen mit Reassoziaten aus ASTACUS-, CANCER- und HOMARUS-Hämocyanin-Untereinheiten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Dissoziation von ASTACUS-Hämocyanin ist nur teilweise reversibel. 24S-Hämocyanin wurde bei pH 9,6 dissoziiert und anschließend zum pH 7,5 zurückdialysiert. Dabei verblieben ca. 20% des Materials als Gemisch von Dimer und Monomeren (5,8S) (Tab.2; Abb.32a,1). Die Mengenangaben in % der Gesamtproteinmenge wurden hier wie im folgenden aus den Schreiberausdrucken der Sedimentationsläufe ermittelt (z.B.Abb.33). Abb.32e zeigt ein EM-Bild des reassozierten Hämocyanins. Etwa 8% des Proteins assoziierten bis zur Stufe von Hexameren. Zwischen hexameren und dodekameren Aggregaten (letztere ca. 20%) traten Reassoziationszwischenstufen auf, die mit ca. 18S (10%) und ca. 21S (30%) sedimentierten (Tab.2). Bei der Elektrophorese (Abb.32a,1,3,7,9-12) wanderten in diesem Bereich mehrere distinkte Banden, zwei davon waren elektrophoretisch identisch mit den 18S-Dissoziationszwischen-

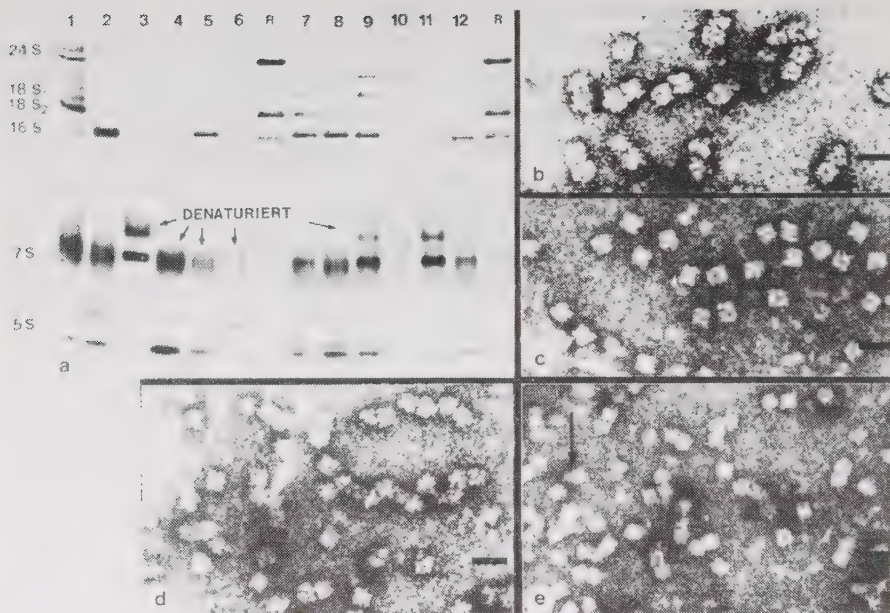


Abbildung 32:

Reassoziation von ASTACUS-Hämocyanin:

(a) Native PAGE (pH 8,8, Anode unten, 5-10% Gel) mit Proben von reassoziiertem ASTACUS-Hc; R = undissoziiertes ASTACUS-Hc; 1 = reassoziertes Gesamtdissoziat; 2 = Reassoziat aus Monomeren nach Abtrennung des Dimers durch Gelfiltration; 3 = Dimer 5: keine Reassoziation (die schwachen Banden im Oligomerbereich erklären sich durch Verunreinigung mit Monomeren; 4 = Untereinheit 1; 5 = Untereinheiten 1 und 2; 6 = Untereinheiten 3/4; 7 = Untereinheiten 1, 2, 3/4 und Dimer 5 im nativen Mengenverhältnis; 8 = Untereinheiten 1, 2 und 3/4; 9 = Untereinheiten 1, 2 und Dimer 5; 10 = Untereinheit 1 und Dimer 5; 11 = Untereinheiten 3/4 und Dimer 5; 12 = Untereinheiten 1, 3/4 und Dimer 5. (b-e) EM-Aufnahmen von ASTACUS-Hc bei ca. 60000-facher Primärvergrößerung, der Balken entspricht jeweils 20 nm; (b) undissoziiertes ASTACUS-Hc (= R in Abb. 32a); (c) = 2 in Abb. 32a; (d) = 7 in Abb. 32a; (e) = 1 in Abb. 32a; Pfeil: 18S-Hc.

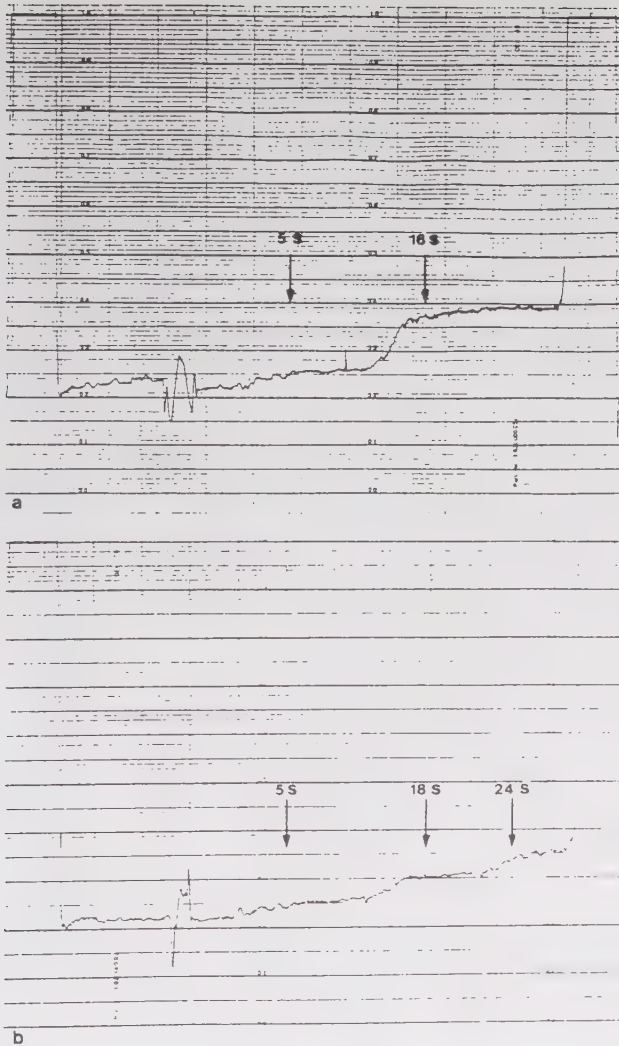


Abbildung 33:

Sedimentationsanalyse von reassoziertem ASTACUS-Hämocyanin:
 (a,b) Original-Registrierungen des UV-Scanners der analytischen Ultrazentrifuge bei 34000UpM nach 40Min; (a) alle Untereinheiten ohne das Dimer (= Probe 2 in Abb.32a): 78% 16S-Hc, 22% 5S-Hc; (b) alle Untereinheiten und das Dimer im nativen Mengenverhältnis (= Probe 7 in Abb.32a): 22% 24S-Hc, 24% 17S (= Heptamer + Hexamer), 18% 6S-Hc (= Monomer + Dimer), größere Aggregate sind hier bereits abzentrifugiert (ca. 36%).

Tabelle 2:
Zusammenfassung der wichtigsten Reassoziat, die bei den Reassoziationsversuchen mit ASTUCUS-,
CANCER- und HOMARUS-Hämocyanin auftraten. Die Quantifizierung der Einzelkomponenten erfolgte
nach den Schreiberausdrucken von Sedimentationsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge. Die
daraus resultierenden Prozentangaben stellen gerundete Werte dar.

		größer als 24S	Dodekamer 24S	Hexamer, Heptamer 20-22S 17-18S	Hexamer 16S	Dimer 7S	Monomer, Dimer 6S	Monomer 5S
ASTACUS	Hc-Dissoziat	12%	20%	30%	18%		20%	
	Monomere nach Gelfiltration					78%		22%
	Monomere nach Isolierung					77%		23%
	Monomere plus Dimer	22%	20%	16%	24%		18%	
	UE 1+2					78%		22%
	UE 3/4					67%		33%
	Dimer 5			11%			89%	
CANCER	Hc-Dissoziat		33%			50%	17%	
	Monomere nach Isolierung		18%			76%	6%	
	UE 1/2					80%		20%
	UE 3					47%	53%	
	UE 4					80%		20%
	UE 1/2+4					95%		5%
	UE 1/2+3					85%		15%
	UE 3+4					55%	45%	
HOMARUS	Hc-Dissoziat		70%			20%		10%
	Monomere nach Isolierung		55%			27%		18%

stufen. Kathodisch von der 24S-Bande fanden sich in der PAGE weitere Proteinbanden, denen nach Sedimentationsanalyse S-Werte von 39(+/-10)S entsprechen (insgesamt ca. 12%, Tab.2). Dabei dürfte es sich um irreguläre Reassoziante handeln (Abb.32a,1,7,9,10). Im EM-Bild erkennt man Ketten von Dodekameren, die unter Winkeln von 60 Grad oder 90 Grad verbunden sind (Abb.32d,e). Das Gemisch der Monomeren 1, 2 und 3/4 ohne das Dimer 5 untersuchte ich in zwei verschiedenen Formen: erstens als Monomeren-gemisch nach Abtrennung des Dimers durch Gelfiltration (S.21), also im nativen stöchiometrischen Verhältnis, und zweitens durch Rekombination der isolierten Monomere im auf S.78 ermittelten Verhältnis. In beiden Fällen kam die Reassoziatio n auf der Stufe von Hexameren zum Stillstand (Ausbeuten: 78% bzw. 77%, Tab.2), der Rest der Untereinheiten blieb monomer (22% bzw. 23%) (Abb. 32a,2,8; EM-Bild: Abb.32c; S-Wert: Abb.33a). Die in beiden Fällen nahezu identischen Ausbeuten an 16S-Hämocyanin sprechen dafür, daß die ermittelte Stöchiometrie der Untereinheiten (UE1 : UE2 : UE3/4 = 4 : 4 : 2) der tatsächlichen Verteilung im nativen Protein entspricht.

Mit Ausnahme des Dimers 5 waren alle Untereinheiten schon allein in der Lage, Hexamere zu bilden (Abb.32a,3,4,6; Tab.2), wobei sich die Ausbeuten zwischen 66% und 73% bewegten. Untereinheit 2 wurde hierbei nicht separat untersucht, sondern nur im Gemisch mit Untereinheit 1. Beide Monomere sind die konstituierenden Untereinheiten des nativen 16S-Hämocyanins. Die homogen aus nur einem Typ von Untereinheit aufgebauten Hexamere unterschieden sich elektrophoretisch (Abb.32a,4,5,6). Die heterogene Population der nativen Hexamere dürfte daher die Monomere 1 und 2 in verschiedenen Mengenverhältnissen enthalten. Dies entspräche den Ergebnissen von Jeffrey et al. (1976) bei CHERAX DESTRUCTOR-Hämocyanin, wo allerdings nach neueren Befunden drei Monomertypen im 16S-Hämocyanin enthalten sind (Jeffrey und Treacy, 1982).

Erst die Kombination der dimeren Untereinheit ASTACUS 5 mit einem oder mehreren Monomeren ermöglichte eine Assoziation über das Niveau von Hexameren hinaus (Abb.32a,7-12). In der analytischen Ultrazentrifuge konnte ich Reassoziante mit Sedimentationskoeffizienten von 18S (dies entspricht Heptameren), 20-21S, 22-24S (dies entspricht Dodekameren) sowie größere Aggregate (bis zu

29S) nachweisen (Abb.33b; Tab.2). Aber erst die Kombination aller Untereinheiten im nativen Mengenverhältnis ergab eine maximale Ausbeute an 24S-Hämocyanin (20%, Tab.2) (Abb.32a,7; Abb.33b). Bei der Vielzahl elektrophoretischer Zwischenbanden handelt es sich wahrscheinlich um Endprodukte von Fehlassoziationen ("dead-end" Produkte). EM-Aufnahmen entsprechender Proben zeigten zahlreiche 24S-Moleküle, daneben aber auch hexamere und heptamere Intermediate sowie kettenförmige Aggregate (Abb.32d,e). Im Muster der nativen PAGE fiel auf, daß nur in den Proben, wo das Dimer 5 und die Untereinheit 2 kombiniert wurden, eine der 18S-Dissoziationszwischenstufe entsprechende Bande auftrat (Abb.32a,1,7,9). Die Kombination von 2 und 5 könnte daher einen Assoziationskeim bei der Aggregation des nativen Hämocyanins darstellen.

b) CANCER-Hämocyanin

CANCER 24S-Hämocyanin wurde bei pH 8,8 dissoziiert und die Vollständigkeit der Dissoziation in der analytischen Ultrazentrifuge überprüft (100% 4,5S). Dieselbe Probe wurde anschließend gegen pH 7,5 dialysiert. In der analytischen Ultrazentrifuge ließen sich 24S-Hämocyanin (33%), 16S-Hämocyanin (50%) und monomer verbliebenes Material (17%) nachweisen (Tab.2). Das elektrophoretische Bandenmuster dieser Probe zeigt Abb.35a,4. Damit gelang es erstmals bei einem Krabben-Hämocyanin, Dodekamere zu rekonstituieren, wenn auch nicht in hoher Ausbeute.

Im gleichartigen Experiment, aber ausgehend von isolierten und in nativer Stöchiometrie kombinierten Untereinheiten erhielt ich ebenfalls 24S-Moleküle, allerdings in geringerer Ausbeute als oben (18% 24S-Hämocyanin, 76% 16S-Hämocyanin, 6% 5S-Hämocyanin) (Abb.34; Abb.35a,10; Tab.2). Das EM-Bild der entsprechenden Probe zeigt eindeutig dodekamere Moleküle (Abb.35d).

Die isolierten Monomere 3 und 4 sowie das Gemisch der Untereinheiten 1/2 aus dem CANCER 24S-Hämocyanin waren jeweils in der Lage, mit sich selbst Hexamere zu bilden, wobei der 16S-Anteil bei den Untereinheiten 1/2 und 4 über 80% lag (Abb.35a,5,7: hier sind die Untereinheiten 1/2 nicht dargestellt, der Wert von 80% entstammt der Sedimentationsanalyse, vgl.Tab.2). Die Reassozi-

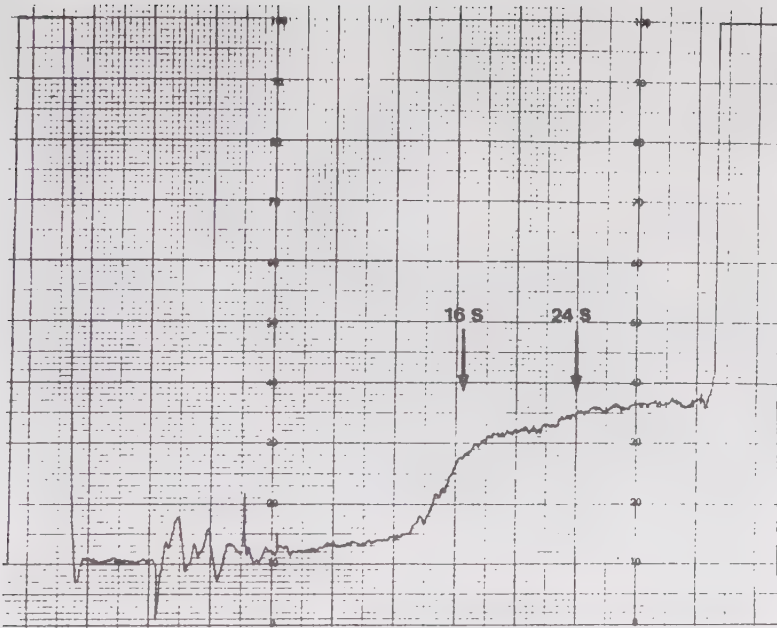


Abbildung 34:

Sedimentationsanalyse der im nativen Mengenverhältnis reassozierten CANCER Hc-Untereinheiten 1-4 (= Probe 10 in Abb.35a); Original-Schreiberausdruck des UV-Scanners der analytischen Ultrazentrifuge (34000 UpM, nach 32 Min.); 18% des Materials reassozierten zu 24S-Molekülen, 76% zu 16S-Molekülen, ca. 8% verblieben monomer.

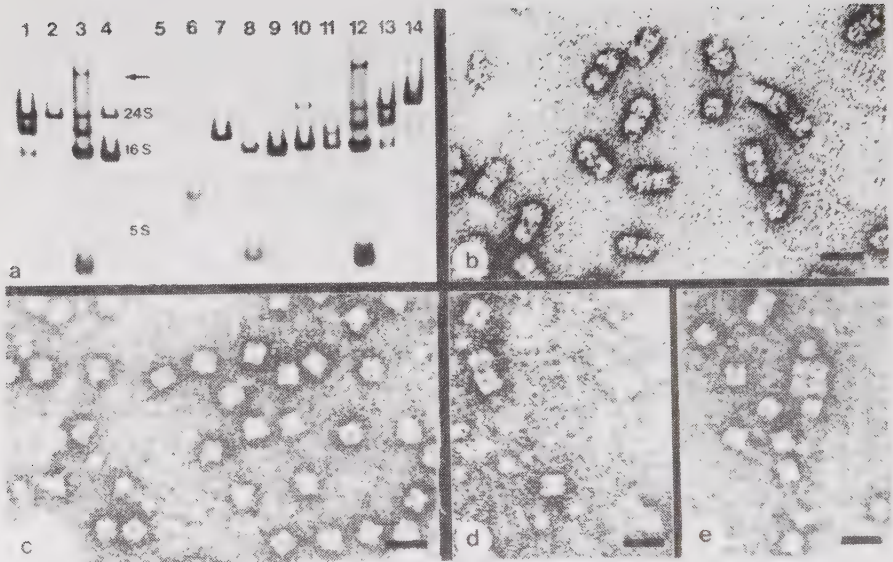


Abbildung 35:

Reassoziation von CANCER-Hämocyanin:

(a) Analytische PAGE der undenaturierten Proteine bei pH 7,5 im System Nr.6 nach Maurer (1968) (Anode unten, 5-10% Gel); 1 = 13 = undissoziiertes CANCER-Pellet; kathodisch vom 24S-Hc wandert 33S-Hc, knapp anodisch davon das 16S-NRP; 2 = CANCER 24S-Hc; 3 = 12 = andissoziiertes CANCER-Pellet mit, von oben nach unten: 33S-Hc, 24S-Hc, 16S-NRP, 16S-Hc und Hc-Monomere; 14 = ASTACUS-Hc Pellet; 4 = reassoziertes CANCER-Hc Dissoziat, der Pfeil markiert die 33S-Komponente; 5 = 7 = Untereinheit 4 reassoziert; 6 = Untereinheit 4 monomer; 8 = Untereinheiten 1-3 reassoziert; 9 = Untereinheiten 1-4 mit 1-3 im Überschuß reassoziert; 10 = Untereinheiten 1-4 im nativen Mengenverhältnis reassoziert; 11 = Untereinheiten 1-4 mit 4 im Überschuß reassoziert: die zweite 16S-Bande entspricht dem Homohexamer aus Untereinheit 4 (vgl. 5 und 7). (b-e) EM-Aufnahmen von CANCER-Hc bei ca. 60000-facher Primärvergrößerung; Länge des Balkens ca. 20nm; (b) CANCER Hc-Pellet (= Proben 1 und 13 in Abb.35a); (c) Untereinheiten 1-3 nach Reassoziaton (= Probe 8 in Abb.35a); (d) Untereinheit 4 nach Reassoziaton (= Proben 5 und 7 in Abb.35a); (e) Untereinheiten 1-4 nach Reassoziaton (= Probe 10 in Abb.35a).

tionstendenz war bei der isolierten Untereinheit 3 am geringsten (47% Hexamer). Die zweite Sedimentationsbande im CANCER 3 Reassoziationsgemisch sedimentierte mit 6,1S (unkorrigiert), entsprechend einer dimeren Aggregationsstufe. Das Gemisch der Untereinheiten 1/2 und 3 reassozierte ebenfalls zu Hexameren (Abb.35a,8; EM-Bild: Abb.35c), die bei der nativen PAGE in eine Position wanderten, welche mit der des nativen 16S-Moleküls (Abb.35a,1,13) identisch ist. Dagegen sind aus reiner Untereinheit 4 aufgebaute Hexamere elektrophoretisch langsamer (Abb.35a,5,7). Im EM-Bild der entsprechenden Proben erkennt man Hexamere und Monomere (Abb. 35d); bei dem Aggregat oben links in dieser Abbildung dürfte es sich um zwei Hexamere und nicht um ein Dodekamer handeln. In der PAGE und bei der Sedimentationsanalyse gab es jedenfalls keinen Hinweis auf dodekamere Reassoziante aus reiner CANCER 4. Die Kombinationen der Untereinheiten 3 und 4 sowie 1/2 und 4 ergaben ebenfalls Hexamere (55% bzw. 85%). Hierbei ist anzumerken, daß 1/2 und 4 das native 16S-Hämocyanin bilden.

Prinzipiell sind also sämtliche Untereinheiten aus CANCER-Hämocyanin Hexamerbildner, wobei diese Eigenschaft bei Untereinheit 3 am schwächsten ausgeprägt ist. Zum Aufbau des 24S-Moleküls sind jedoch alle Untereinheiten gleichzeitig erforderlich (Abb.35a,9, 10,11). Die Ausbeute an Dodekamer war dann am größten (18%, s.o.), wenn die Monomere im nativen stöchiometrischen Verhältnis (UE1/2 : UE4 : UE3 = 6 : 4 : 2) zur Reassoziatioin gebracht wurden (Abb.35a,10).

c) HOMARUS-Hämocyanin

Das 24S-Hämocyanin von HOMARUS dissoziiert bei pH 8,8 in Anwesenheit von 1 mM EDTA (0,05 M Tris/HCl-Puffer) vollständig. Wird dieses Dissoziat wieder in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, 10 mM Calciumchlorid gebracht, so rekombinieren sich die Untereinheiten größtenteils wieder zur 24S-Form (70%) (Tab.2; Abb.37a,1=10). Daneben liegen 20% des Hämocyanins als Hexamer und 10% als Monomer vor. Das Gemisch der isolierten Monomere (1/2/3/5, 4 und 6) bildete bei der Dialyse gegen neutralen Puffer zu 55% 24S-, zu 27% 16S- und zu 18% 5S-Hämocyanin (Abb.36). In der Elektrophorese im System Nr.6 nach Maurer (1968) zerfiel der größte Teil der 24S-Moleküle wieder in Hexamere (Abb.37a,8). Die destabilisie-

rende Wirkung der PAGE auf das 24S-Hämocyanin dürfte ihre Ursache im Entzug von Calciumionen haben (siehe auch S.28).

Die einzelnen, immunologisch unterscheidbaren Fraktionen 1/2/3/5 (= delta), 4 (= alpha) und 6 (= gamma) sind alle imstande, mit sich selbst Hexamere aufzubauen (Abb.27a,3,5,7; Untereinheit 6 ist hier nicht dargestellt).

Für höhere Aggregate sind jedoch sämtliche Untereinheiten gleichzeitig erforderlich (Abb.37a,8,9). Bei keinem der drei Untereinheitentypen konnte ich eine spezifische Funktion als Inter-Hexamer-Verknüpfer erkennen.

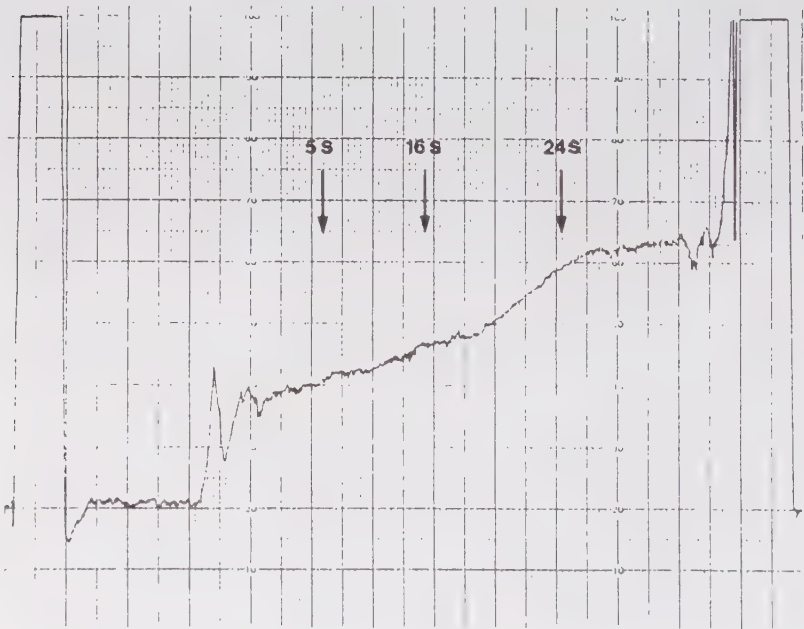


Abbildung 36:

Sedimentationsanalyse der Hämocyanin-Untereinheiten 1-6 aus HOMARUS nach Reassoziatio:

Original-Schreiberausdruck des UV-Scanners der analytischen Ultrazentrifuge (34000 UpM, nach 40Min.; die angehobene Grundlinie bei diesem Versuch war ein gerätbedingtes Artefakt); die untersuchte Probe entspricht Nr.8 in Abb.37a und enthielt ca. 55% 24S-Hc, 27% 16S-Hc und 18% monomeres Hc.

Im elektronenmikroskopischen Bild des reassozierten Gemisches der isolierten Untereinheiten (Abb.37b; entspricht Probe 8 in Abb.37a) waren überraschenderweise nur wenige 24S-Moleküle identifizierbar, obwohl bei der Sedimentationsanalyse 55% Dodekamere festgestellt wurden (Abb.36; Tab.2). Stattdessen traten neben Hexameren ringförmige und halbringförmige Aggregate aus mehreren 24S-Molekülen auf (Abb.37b). Offenbar verlief die Reorganisation der Oligomere des HOMARUS-Hämocyanins teilweise so, daß die Zahl der Bindungsstellen der Monomere durch den Aufbau von Dodekameren noch nicht abgesättigt war, was eine weitere Verkettung von Molekülen ermöglichte. Die Ringstrukturen besitzen jedoch andererseits eine große Regelmäßigkeit, was die Anzahl der beteiligten 24S-Moleküle (je 4 x 24S-Hc) und die Bindungswinkel (ca. 45 Grad) zwischen ihnen betrifft.

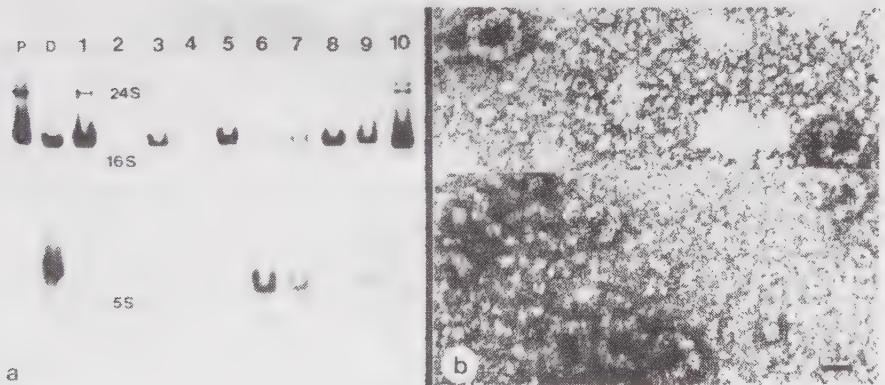


Abbildung 37:

Reassoziierung von HOMARUS-Hämocyanin:

(a) Analytische PAGE der nativen Proteine bei pH7,5 im System Nr.6 nach Maurer (1968) (Anode unten, 5-10% Gel); P = HOMARUS-Hc Pellet (unter den Gelbedingungen teilweise in Hexamere dissoziiert); D = dissoziiertes Pellet (unter den Gelbedingungen teilweise zu Hexameren reassoziert); 1 = 10 HOMARUS-Hc Dissoziat nach Reassoziierung (kathodisch vom 24S-Reassoziat wandert ein größeres Hc-Aggregat); 2 und 4 = Untereinheit 1/2/3/5 monomer (schwache 16S-Bande ist gelbgedingt); 3 und 5 = Untereinheit 1/2/3/5 reassoziert; 6 = Untereinheit 4 monomer; 7 = Untereinheit 4 reassoziert; 8 und 9 = Untereinheit 1-6 reassoziert; in 8 ist eine sehr schwache 24S-Bande zu erkennen. (b) EM-Aufnahme der Probe 8 aus Abb. 37a bei ca. 60000-facher Primärvergrößerung, Länge des Balkens ca. 20nm. Die Aufnahme zeigt Ringe aus acht Hexameren, Halbringe aus vier Hexameren (Mitte rechts), einzelne Dodekamere und Hexamere (Mitte links) und Monomere.

5. Lokalisierung einzelner Untereinheiten durch Immunelektronenmikroskopie

Bei der Immunelektronenmikroskopie werden native Protein-Oligomere mit spezifisch gegen einzelne Untereinheiten gerichteten Immunglobulinen oder monovalenten Antikörperfragmenten markiert und im EM untersucht (Anderson und Stanley, 1941; Aeby et al., 1977). Lake (1978) sowie Stöffler et al. (1980) gelang damit die Lokalisierung zahlreicher Proteine im E.COLI-Ribosom. Die Topologie der Hämocyanine von ANDROCTONUS AUSTRALIS (Lamy et al., 1981b; Sizaret et al., 1982), EURYPELMA CALIFORNICUM (Markl et al., 1981a) und LIMULUS POLYPHEMUS (Lamy et al., 1983a) wurde ebenfalls mit dieser Methode ermittelt.

Ich reinigte die Hämocyanin-spezifischen Antikörper auf zwei verschiedenen Wegen. Für die Markierungsexperimente am CANCER-Hämocyanin wurde die Hämocyanin-spezifische IgG-Fraktion durch Affinitätschromatographie isoliert (Kempter, 1983) und anschließend mit Papain gespalten (Abb.38a-e) (siehe auch Methoden). Für die Versuche mit ASTACUS- und HOMARUS-Hämocyanin verwendete ich die gesamte IgG-Fraktion der Kaninchenserum und trennte die nicht Hämocyanin-spezifischen Immunglobuline (bzw. deren Fragmente) nach der Kopplung mit dem Hämocyanin durch Dünnschichtgelchromatographie ab (Lamy et al., 1981b). Abb.38e zeigt das SDS-Bandenmuster der anti-ASTACUS IgG-Moleküle nach der Papainspaltung (siehe auch Methoden); auf diese Weise wurde die Vollständigkeit der enzymatischen Spaltung routinemäßig überprüft.

Im Elektronenmikroskop erscheinen Fab-Fragmente als stabförmige Partikel, die an Hämocyaninmoleküle angelagert sind. Bei den divalenten Immunglobulinen G ließ sich (z.B. in Abb.39e) deutlich die Ypsilonform erkennen. Das elektronenmikroskopische Bild der Hämocyanine von CANCER (Abb.35b), ASTACUS 8 (Abb.32b) und HOMARUS (Abb.41a-m) zeigt jeweils zwei gegeneinander um 90 Grad verdrehte Hexamere, die über einen annähernd punktförmigen Kontakt miteinander verknüpft sind (van Bruggen et al., 1981; van Bruggen, 1983). Markierungsversuche mit IgG-Molekülen waren im Fall von anti-CANCER 4 IgG's erfolgreich; in den anderen Fällen führte nur das Markieren mit Fab-Fragmenten zu einem befriedigenden Resultat.

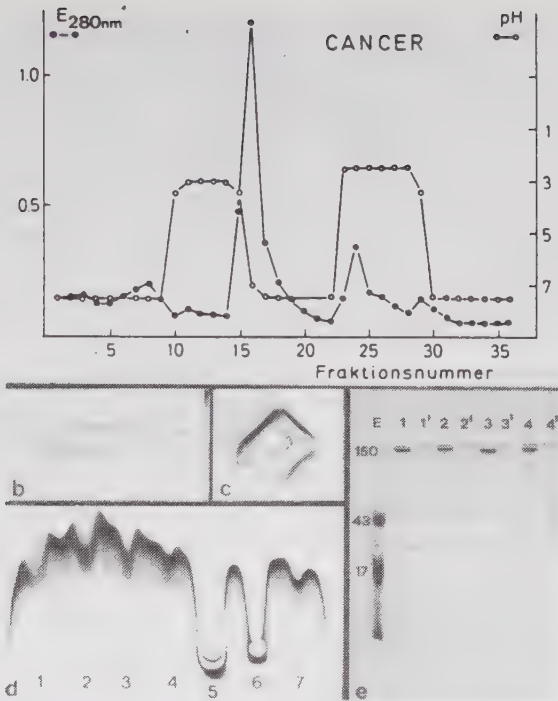


Abbildung 38:

Isolierung der Untereinheiten-spezifischen IgG-Fraktion aus Kaninchenblut und Gewinnung der Fab-Fragmente:
 (a) Elutionsprofil der Affinitätschromatographie (= AC) über BrCN-aktiviertes Biogel A5m mit immobilisiertem CANCER-Hc Dissoziat; aufgetragen wurden 5 ml anti-CANCER 4 Antiserum, die Elution erfolgte bei pH 2,8 und pH 2,2 (pH-Sprünge); (b) IE nach Grabar und Williams (1953); die Anode bei der Elektrophorese war rechts; oben: bei der AC eingesetztes Antiserum, beachte die Präzipitatbögen der verschiedenen Immunglobuline; unten: Fr.15 der AC = reine IgG-Fraktion (nur ein Präzipitat); im Trog: anti-Kaninchen IgG Antiserum (Ziege); (c) Immunodiffusion nach Ouchterlony (1958); im zentralen Loch: dissoziiertes CANCER-Hc, periphere Löcher Fr.15 in verschiedenen Verdünnungen; dies zeigt die Antigen-Bindung durch die isolierte IgG-Fraktion; (d) Untersuchung der Antigenbindungsfähigkeit der anti-CANCER 4 IgG-Fraktion (= Fr.15) und der anti-CANCER 4 Fab-Fragmente aus Fr.15 mit der IE-Technik nach Loft (1975); im Gel: anti-CANCER 4 Antiserum, in der Line: Untereinheit CANCER 4; Anode oben; in den Löchern 1-4: Fab-Verdünnungsreihe; in den Löchern 5-7: drei verschiedenen konzentrierte IgG-Lösungen; Loch 4: Line gerade noch durchbrochen: hier liegt die der vorgegebenen Antigenmenge (CANCER 4) äquivalente Fab-Menge vor; Loch 6: Line gerade noch retardiert: hier liegt die äquivalente IgG-Menge vor; (e) SDS-PAGE ohne β -Mercaptoethanol bei pH 8,8, 10-20% Gel, Anode unten; E = Eichproteine: Ovalbumin (43), Myoglobin (17); Mrx1/1000; 1 = anti-ASTACUS 1 IgG; 2 = anti-ASTACUS 3/4 IgG; 3 = anti-ASTACUS 2 IgG; 4 = anti-ASTACUS 5 IgG; 1'-4' = Proben 1-4 nach Papain-Spaltung (Fab-Fc-Gemische).

a) Lokalisierung der Untereinheiten im ~~CANCER~~ 24S-Hämocyanin

Anti-CANCER 1-3 Fab-Fragmente markierten verteilt über die gesamte Oberfläche des 24S-Moleküls, hauptsächlich jedoch an der Schmalseite des Dodekamers und nur selten am Inter-Hexamer-Kontakt (Abb.39a-d). Anti-CANCER 4 Fab's und IgG's lagerten sich ausschließlich sehr dicht an der Brücke zwischen den Halbmolekülen an (Abb.39e-h). In einigen Fällen wurden zwei Dodekamere über IgG-Moleküle verknüpft (z.B. Abb.39e). Es wurde jedoch meist gegenüber dem Punktkontakt, auf der Seite des schmalen Spaltes markiert (Abb.39f-h). Daraus könnte man schließen, daß Untereinheit 4 zwar sehr nahe am Inter-Hexamer-Kontakt lokalisiert ist, aber nicht die Brücke bildet. Die Vermutung liegt nahe, daß die Untereinheit 3 diese Funktion übernimmt: Dafür spricht einerseits ihre Fähigkeit, stabile Dimere zu bilden (S.38), andererseits stellt Untereinheit 3 nur zwei der zwölf Monomere des Dodekamers (S.78) und schließlich fehlt 3 nach Markl et al. (1979b) im nativen 16S-Hämocyanin. Es erscheint mir daher wahrscheinlich, daß zwei Kopien der Untereinheit 3 den Kontakt zwischen den Hexameren herstellen und je zwei Monomere vom Typ 4 pro Hexamer unmittelbar mit diesen verknüpft sind. Dadurch erklären sich die Ergebnisse der Markierungsversuche für die Untereinheiten vom Typ 4. Je drei Untereinheiten 1/2 schließen das Dodekamer an der schmalen Seite ab. Die Schwierigkeit der exakten Lokalisierung des Monomers 3 als Brückenuntereinheit liegt in seiner immunologischen Identität mit den peripheren Untereinheiten 1/2.

b) HOMARUS-Hämocyanin

Anti-HOMARUS 1/2/3/5 und anti-HOMARUS 6 Fab-Fragmente markierten in der Peripherie des Dodekamers (Abb.40a-h). Für die gamma- und delta-Untereinheiten kann demnach eine Brückenfunktion ausgeschlossen werden. Einige Fab's gegen Untereinheit 4 banden zwar sehr nahe an der Brücke (z.B. Abb.40m), andere jedoch an der Schmalseite des Moleküls (z.B. Abb.40k). Somit konnte durch die Markierungsexperimente der Untereinheitentyp, der den Inter-Hexamer-Kontakt herstellt, nicht eindeutig identifiziert werden (Abb.40i-m); wahrscheinlich ist dies jedoch HOMARUS 4 (alpha).

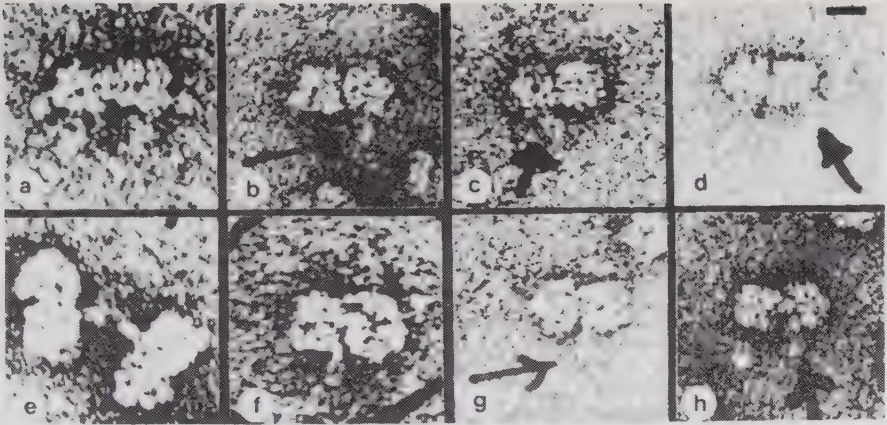


Abbildung 39:

(a-h) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CANCER 24S-Hämocyanin mit angehefteten Fab-Fragmenten und IgG-Molekülen: Primärvergrößerung ca. 60000-fach; der Balken entspricht 10nm; (a-d) anti-CANCER 1-3 Fab; (e) anti-CANCER 4 IgG; (f-h) anti-CANCER 4 Fab.

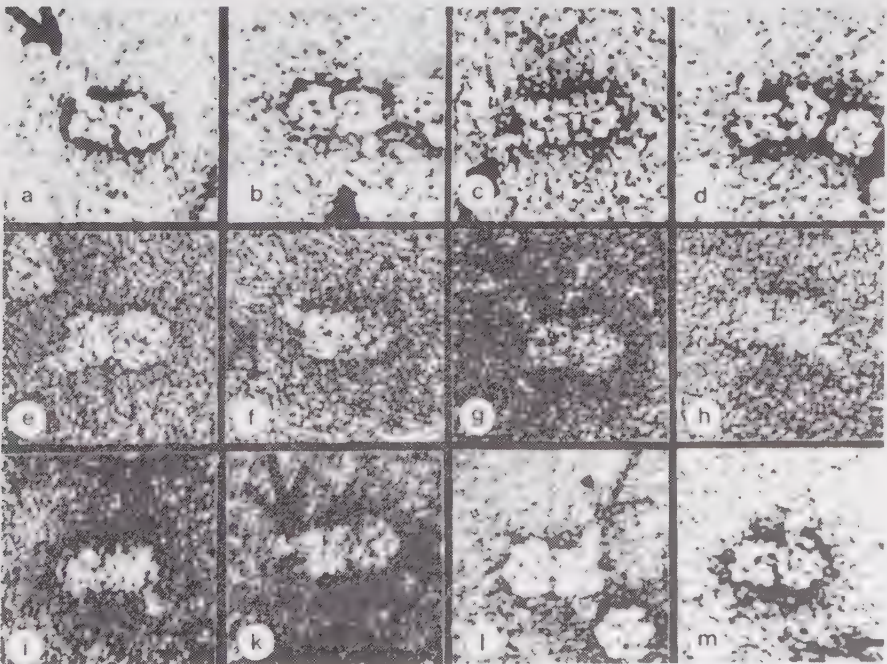


Abbildung 40:

(a-m) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HOMARUS 24S-Hämocyanin mit angehefteten Fab-Fragmenten: Primärvergrößerung ca. 60000-fach; der Balken entspricht 10nm; (a-d) anti-HOMARUS 1/2/3/5 Fab; (e-h) anti-HOMARUS 6 Fab; (i-m) anti-HOMARUS 4 Fab.

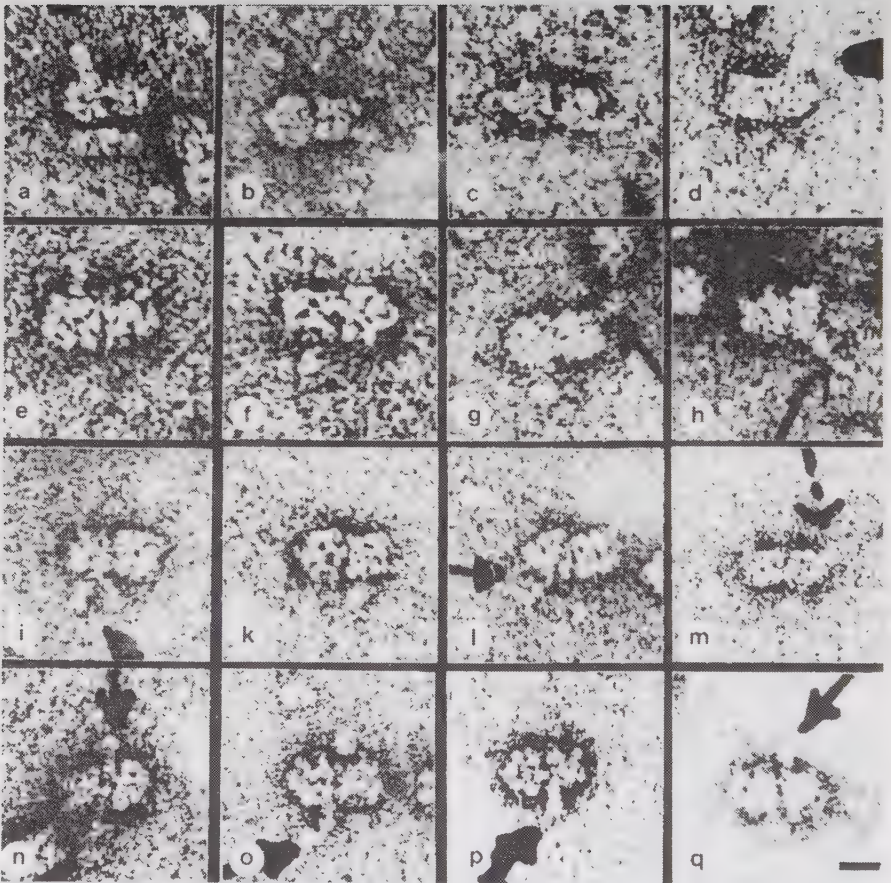


Abbildung 41:

(a-q) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ASTACUS 24S-Hämocyanin mit angehefteten Fab-Fragmenten:

Primärvergrößerung ca. 60000-fach; der Balken entspricht 10nm;

(a-d) anti-ASTACUS 1 Fab; (e-h) anti-ASTACUS 2 Fab;

(i-m) anti-ASTACUS 3/4 Fab; (n-q) anti-ASTACUS 5 Fab.

c) ASTACUS-Hämocyanin

Das nur in einer Ausfertigung im Dodekamer enthaltene ASTACUS Dimer 5 konnte eindeutig am Kontaktpunkt zwischen den beiden hexameren Halbstrukturen lokalisiert werden (Abb.41n-q). Anti-ASTACUS 2 Fab-Fragmente banden hauptsächlich seitlich des Spaltes, an der Längsseite des Dodekamers und nur selten an der Schmalseite (Abb.41e-h). Der umgekehrte Fall traf für anti-ASTACUS 1 Fab-Fragmente zu, die mehrheitlich am schmalen Ende und seltener an der Längsseite der Hämocyaninmoleküle zu finden waren (Abb.41a-d). Untereinheit 3/4 ist nach den Markierungsversuchen ebenfalls an der Schmalseite des Dodekamers lokalisiert (Abb.41i-m). Aus der partiellen immunologischen Verwandtschaft von 3/4 mit dem Dimer 5 (S.22) lassen sich die wenigen Fab-Fragmente in der Nähe der Brücke erklären.

Aufgrund dieser Befunde und unter Berücksichtigung der Daten aus den Reassoziationsversuchen und des stöchiometrischen Mengenverhältnisses der Untereinheiten ($UE1 : UE2 : UE3/4 : UE5 (= \text{Dimer}) = 4 : 4 : 2 : 1$) bildet wahrscheinlich das Dimer die Brücke zwischen den Hexameren. Daran angelagert sind in beiden Hexameren je zwei Kopien der Untereinheit 2. Je zwei Kopien der Untereinheit 1 liegen diesen sechs zentralen Bausteinen benachbart und den Abschluß an den Schmalseiten des Dodekamers bildet je eine Untereinheit vom Typ 3/4.

6. Modellvorschläge für die 24S-Hämocyanine

Aus den Daten, welche die Dissoziationsversuche, die Reassoziationsversuche, die Quantifizierung der Untereinheiten und die Immuielektronenmikroskopie erbrachten, erscheinen die in Abb.42 gezeigten Modelle von ASTACUS- und CANCER-Hämocyanin plausibel. Im Fall von HOMARUS-Hämocyanin ist die Brückenfunktion zwischen den Halbmolekülen weniger klar. Indizien, die für eine Brückenfunktion von Untereinheit 4 sprechen, sind die Ergebnisse der Markierungsversuche sowie die nahe immunologische Verwandtschaft zum Dimer aus ASTACUS. Bei den Cheliceraten-Hämocyaninen hat sich gezeigt, daß immunologisch verwandte Untereinheiten aus LIMULUS, ANDROCTONUS und EURYPELMA identische Rollen beim Aufbau der 37S-Moleküle spielen (van Bruggen et al., 1980; Lamy et al.,

1983b; Markl et al., 1984).

Den Kontakt zwischen den hexameren Halbmolekülen der 24S-Hämocyanine aus ASTACUS und CANCER stellen also mit ASTACUS 5 und CANCER 3 konservative Untereinheiten vom alpha-Typ her; aufgrund des oben gesagten gilt dies eventuell auch im Fall von HOMARUS 4 alpha. Allerdings erfüllen die alpha-Untereinheiten bei den einzelnen Hämocyaninen auch andere Funktionen, wie das Beispiel von ASTACUS 3/4 und CANCER 1/2 zeigt.

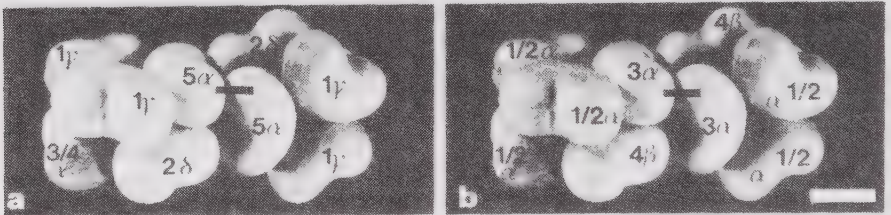


Abbildung 42:

Modelle der dodekameren Hämocyanine von ASTACUS und CANCER: Die Modelle wurden im Maßstab 1 : 10000000 auf der Grundlage der Tertiärstrukturdaten von van Schaick et al. (1981) aus Polyurethan angefertigt (1 nm in der Natur entspricht 1 cm im Modell). Der weiße Balken entspricht 5 nm. Die schwarzen Balken markieren den Ein-Punkt-Kontakt zwischen den Hexameren. (a) ASTACUS 24S-Hc; (b) CANCER 24S-Hc. Die Modelle repräsentieren nur eines der beiden möglichen Enantiomere, die bei der Verknüpfung zweier Hexamere zum Dodekamer entstehen können. Es kann zur Zeit keine Entscheidung getroffen werden, welches Enantiomer nativ tatsächlich vorliegt.

DISKUSSION

1. Die Tendenz der Untereinheiten zur Denaturierung

Die Hämocyanine der Cheliceraten erwiesen sich als relativ stabil gegenüber Denaturierung. Zum Beispiel überstehen die Untereinheiten des Hämocyanins der Vogelspinne EURYPELMA eine Behandlung mit 4 M Harnstoff weitgehend unverändert (Nahke, 1984), mit Ausnahme der Untereinheit c (Kempter, 1983). Eine wochenlange Lagerung der Untereinheiten von EURYPELMA bei 4 Grad Celsius in Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6 hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Sauerstoffbindung (Groß, 1982), und im Muster der zweidimensionalen Immunelektrophorese traten keine Veränderungen auf (Markl, pers. Mitteilung). Der routinemäßige Einsatz von 1 M Harnstoff zur Dissoziation des Hämocyanins des Skorpions ANDROCTONUS oder zur Verhinderung der Reassoziaton des Hämocyanins von EURYPELMA hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Proteinstruktur (Lamy et al., 1979a; Schneider et al., 1980).

Demgegenüber neigten sämtliche in der vorliegenden Arbeit untersuchten Crustaceen-Hämocyanine nach der Dissoziation in die Untereinheiten zur Denaturierung. Diese drückte sich in der nativen PAGE durch das Auftreten diffuser Banden im Dimerenbereich aus. Auch noch weiter kathodisch von den nativen Untereinheiten gelegene, diffuse Banden stellen vermutlich Denaturierungsprodukte dar. Insbesondere zeigten auch die isolierten Untereinheiten in der nativen PAGE fast ausnahmslos eine zweite Bande im Dimerenbereich, wobei die Isolierungsmethode kaum eine Rolle spielte. Diese Assoziation der denaturierten Proteine geht wohl darauf zurück, daß sie sich mit den nach teilweiser Auffaltung exponierten, hydrophoben Innenregionen aneinanderlagern. Die geringe Schärfe der Banden weist darauf hin, daß kein einheitliches Produkt vorliegt, sondern ein Gemisch aus in verschiedenem Ausmaß denaturierten Proteinen. Die Denaturierung verläuft bei den einzelnen Untereinheiten eines Hämocyanins offenbar unterschiedlich leicht, was zur Folge hat, daß bestimmte Untereinheiten nach und nach aus dem nativen Gesamtmuster "verschwinden"; dies hatte bereits Schneider (1978) bei der Untereinheit e aus EURYPELMA beobachtet.

Die denaturierten Anteile vermehren sich bei der Lagerung, wobei

eine Dissoziation bzw. Aufbewahrung in 0,1 M Tris/HCl/EDTA-Puffer bei pH 8,8 weniger dramatische Effekte zeigte als der Glycin-Puffer von pH 9,6 ($I = 0,05$). In Tris-Puffer konnte ich auch die sehr labile Untereinheit HOMARUS 6 nativ gewinnen. Allerdings hatte der niedrigere pH-Wert den Nachteil, daß die meisten von mir untersuchten Hämocyane unter diesen Bedingungen nicht quantitativ in die Untereinheiten dissoziierten, bzw. bei Isolierung der Monomerenfraktion durch Gelfiltration zur Reassozi-ation neigten.

Durch Dialyse gegen 4 M Harnstoff konnte ich sämtliche Untereinheiten von ASTACUS, HOMARUS und CANCER quantitativ denaturieren. Diese Denaturierung geht mit einem Verlust des Kupfers einher, wie an diversen Beispielen durch Atomabsorptions-Spektroskopie nachgewiesen wurde. Eine Renaturierung habe ich niemals beobachtet, allerdings wurden diesbezüglich keine gezielten Versuche unternommen. Bei Crustaceen-Hämocyaninen ist der Wiedereinbau von Kupfer in entkupferte Untereinheiten bisher lediglich bei CARCINUS MAENAS dokumentiert, wobei besondere Bedingungen herrschten, z.B. ein pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes (Salvato et al., 1981; Beltramini und Lerch, 1983).

Im Gegensatz zum Muster der nativen PAGE ließ sich die fortschreitende Denaturierung der Untereinheiten in der SDS-PAGE nicht erkennen. Es wurden also keine kovalenten Bindungen gespalten, sondern es handelte sich um eine allmähliche Auf- bzw. Umfaltung der Tertiärstruktur, offenbar bedingt durch das veränderte Ionenmilieu und andere Einflüsse. Zu diesen könnten zählen die bei der Elektrophorese auftretende erhöhte Temperatur, das elektrische Feld, die Verdünnung insbesondere bei der Gelfiltration sowie die Adsorption an die Ionenaustauschermatrix.

Im Muster der zweidimensionalen Immunelektrophorese war denaturiertes Hämocyanin gut zu erkennen: Es drückte sich durch ein diffuses, mit nativem Hämocyanin nicht kreuzreagierendes Präzipitat aus, das schlechter mit dem Antiserum reagierte als das native Protein und deshalb in der zweiten Dimension weiter in das antikörperhaltige Gel eindringen konnte. Manchmal traten Übergangsstadien auf, die noch mit dem nativen Hämocyanin partiell identisch waren, wobei es sich um eine immunologische Defizienz der teilweise denaturierten Komponenten handelte.

Kempton (1983) hatte bei EURYPELMA gefunden, daß Apo-Untereinheiten, die durch schonenden Entzug des Kupfers erhalten worden waren, immunologisch defizient gegenüber nativen Untereinheiten reagierten.

Durch Alterung denaturiertes Crustaceen-Hämocyanin war immunologisch identisch mit Hämocyanin, das einer Behandlung mit 4 M Harnstoff unterzogen worden war. Die klaren immunologischen Unterschiede zwischen den Untereinheiten eines Hämocyanins verschwanden mit zunehmender Denaturierung; das Endprodukt war stets ein völlig homogener, diffuser Gipfel. Die Untereinheiten alpha, gamma und delta von HOMARUS sind hierfür ein Beispiel. Kempton (1983) hatte festgestellt, daß die 7 immunologisch nicht miteinander verwandten Polypeptidketten des Hämocyanins aus EURYPELMA nach Denaturierung in 8 M Harnstoff immunologisch identisch reagieren. Ebenfalls immunologisch identisch oder zumindest sehr ähnlich reagierten denaturierte Hämocyanine aus verschiedenen Krebsarten. Daß dieses Phänomen in früheren Untersuchungen nicht erkannt und auch von mir anfangs unterschätzt wurde, blieb nicht ohne Konsequenzen: Z.B. isolierten Markl und Kempton (1981a) die Untereinheit HOMARUS 6 nur in denaturierter, kupferfreier Form und konnten sie somit nicht eindeutig als Hämocyanin identifizieren. Aus ähnlichen Gründen unterliefen uns einige Fehlinterpretationen in einer vorläufigen Publikation der gegenwärtigen Daten (Markl et al., 1983).

Vermutlich sind für die immunologische Verwandtschaft denaturierter Untereinheiten strukturell konservative Antigendeterminanten verantwortlich, die beim nativen Hämocyaninmolekül im Inneren liegen und bei der Denaturierung exponiert werden. Gleichzeitig dürften die für die ursprüngliche Verschiedenheit der Untereinheiten verantwortlichen Oberflächendeterminanten unzugänglich für den Angriff der Antikörper werden. Ähnliches wurde auch von anderen Proteinen, z.B. Lysozymen, berichtet (Young und Leung, 1970; Arnheim et al., 1971). Dickerson (1971) zeigte am Beispiel des Cytochroms C, daß das hydrophobe Innere eines globulären Proteins strukturell konservativer ist als die hydrophile Peripherie. Die Peripherie dürfte für die Adaptation eines Proteins an die Situation in einem ganz bestimmten Tier verantwortlich sein und ist deshalb von der Evolution wesentlich formbarer als das Innere, wo Veränderungen der Primärstruktur die Tertiärstruktur

und damit die Funktion als solche stark beeinflussen können und sich daher seltener manifestieren.

2. Die Rolle der Untereinheiten beim Aufbau der Quartärstruktur

a) Die Dissoziation der Hämocyanin-Oligomere

Im allgemeinen ist bei marinen Crustaceen zur Stabilisierung der Dodekamerstruktur die Anwesenheit divalenter Kationen (Calcium, Magnesium) notwendig (vgl. z.B. Mangum, 1983). Die Hämocyanine von *CANCER*, *PALAEMON*, *PANULIRUS*, *PALINURUS* und *PAGURUS* dissoziierten bei pH 8,8 quantitativ in die Untereinheiten, wenn ich dem Puffer 10 mM EDTA hinzufügte. Das Hämocyanin der Süßwasserkrabbe *POTAMON EDULIS* dissoziiert bereits beim physiologischen pH vollständig, wenn dem Milieu Calciumionen entzogen werden (Chantler et al., 1973). Im Gegensatz dazu wird beim Flußkreb *CHERAX* die Stabilität des Dodekamers durch Calciumentzug nicht wesentlich beeinflusst (Murray und Jeffrey, 1974) und auch *ASTACUS*-Hämocyanin ist sehr schwer dissoziierbar. *CHERAX* besitzt ebenso wie *ASTACUS* ein Disulfid-verbrücktes Dimer, welches den bisher untersuchten marinen Astacura fehlt. Zweifellos ist dieses Dimer für die Stabilität des nativen Dodekamers verantwortlich. Während das marine Milieu relativ stabil ist, was sich in den Ionenverhältnissen der Hämolymphe widerspiegelt, kann bei Flußkrebsen der Calciumgehalt der Hämolymphe durchaus 10 mM unterschreiten (Lienemann, 1938) und auch pH-Erhöhungen über pH 8,0 sind nicht selten (Cameron, 1978). Möglicherweise ist die Stabilität des nativen Hämocyanins bei Flußkrebsen also als Anpassung an schwankende Umweltbedingungen zu verstehen.

Die Hämocyanine von *ASTACUS*, *GALATHEA* und *EUPHAUSIA* dissoziierten nicht quantitativ. Stets lag ein erheblicher Anteil des Materials in der heptameren oder hexameren Form vor und konnte auch im alkalischen Milieu und bei Anwesenheit von EDTA nicht weiter zerlegt werden. Andererseits bestand dieser nichtdissoziierbare Anteil den Ergebnissen der SDS-PAGE zufolge aus den gleichen Untereinheiten wie das übrige Hämocyanin. Ähnliche Verhältnisse wurden auch bei anderen Crustaceen-Hämocyaninen gefunden (Terwilliger et al., 1979; Markl et al., 1979b). Das Hämocyanin der Garnele

PENAEUS SETIFERUS ließ sich ohne denaturierende Agenzien überhaupt nicht in Untereinheiten zerlegen (Brouwer et al., 1978). Terwilliger (1982) äußerte die Hypothese, daß der undissoziierbare hexamere Anteil von LIGIA-Hämocyanin Produkt einer Reassoziaton bereits dissoziierten Materials sei. Dieses Reassoziat sollte unkorrekt zusammengebaut sein und dabei Stabilität gegen das alkalische Milieu erlangen. Dies wäre auch eine brauchbare Erklärung für meine diesbezüglichen Ergebnisse, besonders wenn man berücksichtigt, daß die von mir untersuchten Hämocyanin-Untereinheiten bei partieller Denaturierung zur Bildung von Dimeren und höheren Aggregaten neigten: Partiiell denaturierte Hämocyanin-Untereinheiten könnten sich zu schwer dissoziierbaren "Misfits" zusammenlagern.

b) Die Reassoziaton der Hämocyanine aus ASTACUS, CANCER und HOMARUS

Auch der umgekehrte Vorgang, die Reassoziaton, verläuft bei Crustaceen-Hämocyaninen nur unvollständig; insbesondere die Rekonstitution des Dodekamers gelang bisher nur selten (S.76). Allerdings ließen sich in 0.1 M Trispuffer von pH 7,5 sowohl bei CANCER als auch bei ASTACUS und HOMARUS die Untereinheiten zum Dodekamer reassoziieren, wobei ich in Gegenwart von 10 mM Calcium die höchsten Ausbeuten erzielte. Das beste Reassoziationsvermögen zeigte erwartungsgemäß das direkt aus der Dissoziaton erhaltene Gesamtgemisch der Untereinheiten, während eine künstliche Mischung vorher einzeln isolierter Untereinheiten schlechter reagierte. Zweifellos waren im zweiten Fall Untereinheiten durch die verschiedenen Isolierungsverfahren partiell geschädigt. Im günstigsten Fall konnte ich ca. 55% (HOMARUS-Hämocyanin) des eingesetzten Materials zum Dodekamer reassoziieren. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen beim dodekameren Hämocyanin der Spinne CUPHENNIUS, die übrigens in Gegenwart von 40 mM Calcium zustandekamen (Markl, 1980; Markl und Kempster, 1981b). Diese Werte bleiben jedoch weit zurück hinter dem Reassoziationsvermögen des Hämocyanins der Vogelspinne EURYPELMA, bei der das 24-mer mit nahezu 100% Ausbeute rekonstituiert werden konnte (Decker et al., 1980; Markl et al., 1982).

Bei HOMARUS AMERICANUS beschrieben Morimoto und Kegeles (1971)

ein Calciumionen-abhängiges Gleichgewicht zwischen 16S-Halbmolekülen und 24S-Molekülen. Nach der Dissoziation der Halbmoleküle in die Untereinheiten reassoziierten die konstituierenden Monomere bei pH-Senkung und Erhöhung der Calcium-Konzentration zwar teilweise zu Hexameren, diese waren jedoch - im Gegensatz zu meinen Ergebnissen - nicht in der Lage, zu dimerisieren. Ähnliche Verhältnisse fanden Roxby et al. (1974) beim Hämocyanin aus *CALLIANASSA CALIFORNIENSIS* vor, wo nur ein Teil der reassozierten Hexamere zur weiteren Aggregation befähigt war; die Autoren unterschieden daraufhin zwischen "kompetenten" und "nicht-kompetenten" Hexameren. Als nicht-kompetent in diesem Sinne wurden auch die nativ in der Hämolymphe vorkommenden Hexamere bezeichnet (Miller et al., 1977).

Für die unvollkommene Reorganisation des Dodekamers der Crustaceen-Hämocyanine sind mehrere Ursachen denkbar:

- (1) Van Holde und Miller (1982) vermuteten, daß sich bei der Assoziation Untereinheiten falsch zusammenlagern, so daß die entstehenden Oligomere nicht zur weiteren Aggregation befähigt sind. Insbesondere ein Fehleinbau der Brücken-Untereinheit dürfte sich hemmend auswirken.
- (2) Fehl ASSOZiationen könnten ihre Ursache auch darin haben, daß partiell denaturierte Untereinheiten mit eingebaut werden.
- (3) Schließlich ist denkbar, daß die angewendeten Reassoziationsbedingungen nicht ideal waren; so bildete sich z.B. beim Vogelspinnen-Hämocyanin in Gegenwart von 40 mM Calcium ein 16S-"Misfit" (Decker et al., 1980). Aber es könnten auch bisher unbekannte und bei der Dissoziation verlorengegangene, niedermolekulare Effektoren eine Rolle spielen.

Bei *ASTACUS* und *HOMARUS* treten bei der ReassoziatioN auch Oligomere von Dodekameren auf, wobei letztere in typischen Winkeln miteinander verknüpft sind. Bei *HOMARUS* bildeten sich sogar definierte Ringe aus vier Dodekameren. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß brückenbildende Untereinheiten an falscher Position eingebaut wurden. Ähnliches beobachtete auch Markl (1980) am Hämocyanin aus *CUPIENNIUS SALEI*.

Sämtliche Untereinheiten aus *ASTACUS*, *CANCER* und *HOMARUS* erwiesen sich als kompetent zur Bildung von Homohexameren, mit Ausnahme des Dimers aus *ASTACUS*. Bei *CANCER* 3 war die Ausbeute an

Hexamer relativ niedrig (47%), jedoch wurden 53% als Dimer erhalten. Daß Untereinheiten Homohexamere bilden können ist bei den 24- und 48-meren Hämocyaninen der Cheliceraten nur selten der Fall, z.B. bei LIMULUS IV (Brenowitz, 1982). Bei den Dodekameren der Krebse und Spinnen ist dies dagegen häufig anzutreffen (z.B. Marlborough et al., 1981; Markl und Kempter, 1981b).

c) Diskussion der Ergebnisse aus Immuno-Markierungs-Experimenten und Reassoziationsversuchen für die einzelnen Untereinheiten:

ASTACUS LEPTODACTYLUS-Hämocyanin:

Das ASTACUS 24S-Hämocyanin setzt sich wie folgt aus Untereinheiten zusammen: 1 x Dimer 5 (entspricht zwei Polypeptidketten), 2 x Untereinheit 3/4, 4 x Untereinheit 1 und 4 x Untereinheit 2.

ASTACUS-Dimer 5:

Das Dimer dient eindeutig als Brücke zwischen den hexameren Hälften des Dodekamers. Dies ging sowohl aus den Fab-Markierungen als auch aus dem Dissoziationsverhalten des 24S-Moleküls hervor, wobei charakteristische 18S-Zwischenstufen auftraten. Auch bei Spinnen-Hämocyaninen fand man definierte 30S- und 18S-Dissoziations-Zwischenstufen, bei denen stabile Dimere aus 3x6-, bzw. 1x6-Strukturen herausragten, was als Beweis für die Brückenfunktion der Dimere gewertet wurde (Markl, 1980; Markl et al., 1981b; Markl et al., 1981c). Bei den Reassoziationsversuchen war das ASTACUS-Dimer die einzige Komponente, die mit sich selbst keine Hexamere aufbauen konnte. Andererseits wurden nur bei seiner Anwesenheit im Gemisch der Untereinheiten Strukturen gebildet, die größer als Hexamere waren.

ASTACUS-Untereinheit 2:

Untereinheit 2 ist nach den Markierungsversuchen dem Dimer direkt benachbart und ist näher am Inter-Hexamer-Spalt lokalisiert als 1 und 3/4. Bei den Reassoziationsexperimenten trat nur dann, wenn 2 neben dem Dimer 5 vorhanden war; in der nativen PAGE eine Proteinbande in Höhe der 18S-Dissoziationszwischenstufe auf. Dies spricht dafür, daß 2 und 5 einen Assoziationskeim beim Dodekamer-aufbau bilden.

ASTACUS-Untereinheiten 1 und 3/4:

Die Untereinheiten 1 und 3/4 wurden an den Schmalen Enden des 24S-Moleküls lokalisiert. Die Untereinheiten vom Typ 1 sind mit Sicherheit symmetrisch verteilt, d.h. in jedem der beiden Hexamere vertreten. Dies demonstrieren die zweifach mit Fab-Fragmenten markierten Moleküle deutlich. Nach der idealisierten Modellvorstellung in Abb.42 und eine symmetrische Verteilung vorausgesetzt, dürften die zwei Exemplare des Untereinheitentyps 3/4 den peripheren Abschluß an den Schmalseiten bilden. Dies bestätigte sich bei den Markierungsversuchen jedoch nicht: Es wurden sowohl periphere Positionen, als auch solche nahe am Inter-Hexamer-Kontakt von Fab-Fragmenten besetzt. Letztere gehen aber sicher auf die partielle immunologische Verwandtschaft von 3/4 (alpha) mit dem Dimer 5 (alpha) zurück.

CANCER PAGURUS-Hämocyanin:

Die Untereinheiten des CANCER 24S-Hämocyanins sind im Verhältnis UE1/2 : UE3 : UE4 wie 6 : 2 : 4 vertreten.

CANCER-Untereinheiten 1-3:

Die Untereinheiten 1-3 sind immunologisch eng verwandt und den Markierungsversuchen zufolge hauptsächlich in der Peripherie des Dodekamers an den Schmalseiten angesiedelt. Allerdings banden 1-3 Fab-Fragmente auch in der Nähe des Kontaktbereiches der Hexamere. Die Untereinheit 3 unterscheidet sich durch eine Reihe von Eigenschaften von 1/2, die stark dafür sprechen, daß 3 die Brückenfunktion zwischen den Hexameren übernimmt:

(1) Untereinheit 3 kommt zweimal im Dodekamer vor und ist als einzige in der Lage, zu dimerisieren. Eine Verknüpfung der Halbmoleküle über zwei Untereinheiten vorausgesetzt spricht dies für die Brückenfunktion von 3. In einer vergleichenden Studie stellten Markl et al. (1981b) fest, daß in Arthropoden-Hämocyaninen, die stabile Dimere enthalten, diese höchstwahrscheinlich an der Hexamerverknüpfung beteiligt sind.

(2) Die Tendenz der Einzelkomponenten, bei der Reassoziaton Homohexamere auszubilden ist bei den Untereinheiten 1/2 und 4 stärker als bei 3, die vorwiegend dimerisiert.

(3) Das native Hexamer setzt sich nur aus den Untereinheiten 1/2 und 4 zusammen; es könnte ein Fehl ASSOZIAT darstellen, bei dem der Hexamer-Verknüpfker 3 nicht eingebaut wurde.

(4) Bei der Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung der Untereinheiten wurde wiederholt ein 16S-Reassoziat eluiert, das nur aus den Monomeren 1/2 und 4 aufgebaut war, also dem nativen Hexamer entspricht, obwohl hier 3 zugegen war.

(5) Beim Hämocyanin der Schwimmkrabbe *CALLINECTES SAPIDUS*, die nahe mit *CANCER* verwandt ist, traten im EM-Bild reassoziierter alpha-Untereinheiten heptamere Aggregate auf (Raeder, 1984). Dies weist auf die Brückenfunktion der konservativen alpha-Komponente hin.

CANCER-Untereinheit 4:

Untereinheit 4 kommt im *CANCER* 24S-Hämocyanin in vier Kopien vor. Nach den Markierungsergebnissen sind diese Untereinheiten sehr nahe an der Brücke zwischen den Hexameren lokalisiert. Bevor die besonderen Eigenschaften der Untereinheit 3 bekannt waren wurde daher angenommen, daß 4 die Brücke bildet. Setzt man einen Kontakt über eine Kontaktfläche voraus (van Bruggen et al., 1981; van Bruggen, 1983), so ist es unwahrscheinlich, daß 4 als Brücke dient, weil dann schon 2 Polypeptidketten vom Typ 4 genügen. Außerdem reassoziert 4 zu Homohexameren und ist zusammen mit 1/2 im nativen 16S-Hämocyanin enthalten. Das variable Monomer 4 scheint also eher eine "Hexamer-Bildner-", als eine "Hexamer-Verbinder-Untereinheit" zu sein. Es ist jedoch möglich, daß 4, obwohl nicht selbst Brücken-Untereinheit, bei der Verknüpfung der Hexamere mitwirkt, denn erst das Zusammenwirken sämtlicher Untereinheiten-Typen ermöglicht den Aufbau von 24S-Molekülen. Überraschenderweise ist die mit *CANCER* 4 immunologisch verwandte variable Untereinheit aus *CALLINECTES SAPIDUS* in der Lage Homododekamere mit sich selbst zu bilden (Raeder, 1984). Eine Eigenschaft, die bisher allenfalls bei den immunologisch einheitlichen Polypeptidketten der anomuren Krebse aufgetrat. Dort allerdings sind die Untereinheiten elektrophoretisch heterogen und es sind sowohl alpha- als auch gamma- und delta-Determinanten vorhanden.

HOMARUS AMERICANUS-Hämocyanin:

Nach den Reassoziationsergebnissen waren beim HOMARUS-Hämocyanin alle drei Untereinheitentypen nötig, um Dodekamere aufzubauen. Dabei hob sich keine der drei Komponenten durch besondere Eigenschaften von den anderen ab. Sowohl 1/2/3/5 als auch 4 und 6 reassoziieren in isolierter Form zu Homohexameren, sind also prinzipiell Hexamer-Bildner. Den Markierungsversuchen zufolge konnte keiner der Untereinheitentypen eindeutig als Brücken-Bildner identifiziert werden. Anti-1/2/3/5- und anti-6-Fab-Fragmente markierten stets an den schmalen Enden des Dodekamers und waren nie in der Mitte der Moleküllängsseite zu finden. Anti-HOMARUS 4-Fab-Fragmente banden ebenfalls mehrheitlich abseits des Inter-Hexamer-Kontaktes. Die wenigen Fab's in dessen Nähe sowie die immunologische Verwandtschaft von HOMARUS 4 (alpha) mit dem Dimer 5 (alpha) aus ASTACUS weisen allerdings auf die Verknüpf-Funktion von 4 hin. Die Quartärstruktur des HOMARUS-Dodekamers scheint weniger exakt aufgebaut zu sein als die der Dodekamere aus ASTACUS und CANCER. Bei HOMARUS fehlt ein stabiles Dimer, der Kontakt zwischen den Halbmolekülen wird durch Ionenbrücken hergestellt (Morimoto und Kegeles, 1971; Herskovits et al., 1983), die möglicherweise weniger spezifisch sind.

Die Auswertung der Ergebnisse der Immuielektronenmikroskopie war bei den Crustaceen-Hämocyaninen aus mehreren Gründen problematischer als bei Cheliceraten-Hämocyaninen (z.B. Markl et al., 1981a). Hier ist erstens zu nennen, daß bei den Crustaceen Hämocyanin-Untereinheiten vorkommen, die zwar immunologisch identisch, aber elektrophoretisch heterogen sind. Bei der Untereinheit CANCER 3 wird diese Problematik deutlich: Sie bildet wahrscheinlich die Brücke, kann aber bei der Fab-Markierung nicht von 1/2 unterschieden werden. Eine zweite Schwierigkeit ergibt sich aus der Quartärstruktur der 24S-Moleküle selbst: Nimmt man eine Untereinheit an, deren Längsachse parallel zur Längsachse des Gesamt-moleküls orientiert ist (z.B. ASTACUS 2 (delta) in Abb.42b), so wird deutlich, daß Fab-Fragmente sowohl peripher als auch nahe an der Nahtstelle zwischen den Halbmolekülen binden können.

Die vorliegenden Ergebnisse haben die Vorstellung von der Quartärstruktur einiger Crustaceen-Hämocyane zwar erhellt, zum genauen Verständnis sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig. So wäre es denkbar, mit Hilfe monoklonaler Antikörper zwischen bisher immunologisch identisch erscheinenden Untereinheiten differenzieren zu können. Dadurch hätte man ein Werkzeug, das in der Immunelektronenmikroskopie eine genauere Lokalisierung der Untereinheiten ermöglichen sollte.

3. Die Zahl der Untereinheiten

Die Zahl elektrophoretisch unterscheidbarer Untereinheiten in Arthropoden-Hämocyaninen wächst mit zunehmender Komplexität der oligomeren Struktur (Markl und Kempster, 1981b). Eine zwingende Korrelation zwischen Untereinheitenzahl und dem jeweiligen Oligomertyp gibt es jedoch nicht: Native Hexamere enthalten zwischen 2 und 5 elektrophoretisch unterscheidbare Untereinheiten, native Dodekamere zwischen 3 und 7 (Linzen, 1983). Die Zahl immunologisch identifizierbarer Komponenten ist in der Regel kleiner, d.h. häufig erwiesen sich elektrophoretisch distinkte Untereinheiten als immunologisch homogen, wobei der Polymorphismus sicher nicht auf Artefaktbildung zurückgeht, sondern genetisch fixiert ist (Markl und Kempster, 1981b; Brenowitz et al., 1981). Ähnliches tritt auch bei sämtlichen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Hämocyaninen auf.

Folgende alpha-Untereinheiten sind (intraspezifisch) immunologisch identisch (vgl. Tab.3 und Abb.45 auf S.122 bzw. S.123): CANCER 2 und 3; OCYPODE 1 bis 4; ASTACUS 3 und 4; EUPHAUSIA 1 bis 4. Von den delta-Untereinheiten trifft dies zu für: HOMARUS 1,2,3 und 5; PALINURUS 1 bis 4; PANULIRUS 90K bis 94K; PALAEMON 1 bis 3. Die immunologisch völlig homogene Untereinheiten-Fraktion der Anomuren-Hämocyane spaltet sich in 7 (PAGURUS) bzw. 9 (GALATHEA) elektrophoretisch distinkte Banden auf. Die Untereinheiten vom Typ beta und gamma zeigten keinen Polymorphismus. Allerdings fand jedoch Raeder (1984), beim Hämocyanin der Krabbe CALLINECTES SAPIDUS zwei beta-Untereinheiten.

Über die Funktion des elektrophoretisch erkennbaren Polymorphismus immunologisch identischer Untereinheiten ist noch wenig bekannt. Linzen (1983) vermutete mögliche Aufgaben bei der Adap-

tation an die jeweiligen Umweltbedingungen, schloß andererseits jedoch eine Funktionsneutralität des Phänomens nicht aus. Nach der "Neutralen Theorie der molekularen Evolution" (Kimura, 1983) wird die Mehrheit evolutiver Veränderungen auf molekularer Ebene durch die Fixierung neutraler oder nahezu neutraler Mutationen verursacht. Auf diese Weise wird zunächst eine breite Palette genetisch abgewandelter molekularer Bausteine bereitgestellt, die dann bei veränderten Umweltbedingungen einem Selektionsdruck unterliegen können (vgl. hierzu auch Nei, 1983). Beispiele hierfür liefern in einer Vielzahl allotyper Formen auftretende Enzyme wie z.B. die Lactat-Dehydrogenase (Selander, 1976).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Untereinheit 3 des Hämocyanins aus CANCER, die zwar immunologisch nicht von Untereinheit 2 unterscheidbar ist, aber im Gegensatz zu dieser dimerisieren kann und vermutlich die Inter-Hexamerbrücke ausbildet. Die immunologische Identität wurde bisher mit 5 verschiedenen Antisera festgestellt und ist im übrigen bei den Hämocyaninen von MAJA SQUINADO und CARCINUS MAENAS in ähnlicher Weise manifestiert (Markl und Kempster, 1981a,b). Hier besteht also eine Funktionsheterogenität, die nicht mit einer immunologischen Heterogenität einhergeht.

Theoretischen Überlegungen von Klarman et al. (1979) sowie Klarman und Daniel (1981) zufolge genügt ein Typ von Untereinheit, um Hämocyanin-Hexamere aufzubauen, während zur Konstruktion eines Dodekamers mindestens drei verschiedene Bausteine nötig sein sollen. Dabei gingen die Autoren von kugelförmigen Untereinheiten sowie einem sehr engen Kontakt zwischen den hexameren Halbstrukturen aus. An diesem Kontakt sollten insgesamt sechs der zwölf Untereinheiten beteiligt sein.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von van Bruggen et al. (1981) sowie van Bruggen (1983) ergaben jedoch, daß bei den Dodekameren von ASTACUS, HOMARUS UND CANCER sehr wahrscheinlich nur zwei der Untereinheiten die Inter-Hexamer-Brücke bilden. In einem solchen Fall genügt das Vorhandensein von zwei verschiedenen Untereinheitentypen: einem "Hexamer-Bildner" und einem "Brückenbildner", wie am Beispiel des Hämocyanins aus der Spinne CUPIENNIUS von Markl (1980) demonstriert wurde.

Bisher bestand durchweg diese an Hämocyaninen der Cheliceraten sowie an CHERAX-Hämocyanin erarbeitete Auffassung, daß es neben Hexamerformern mindestens einen zweiten, immunologisch distinkten Untereinheitentyp geben muß, der als Hexamerverknüpfer fungiert (van Bruggen et al., 1980; Jeffrey et al. 1981; Markl, 1980; Lamy et al., 1981b, 1983a; Markl et al., 1981a). Dies scheint jedoch zumindest für die Hämocyanine der Anomuren und der Brachyuren nicht zuzutreffen: Bei OCYPODE, GALATHEA und PAGURUS sind immunologisch homogene Untereinheitenfraktionen in der Lage, Dodekamere aufzubauen.

Es scheint nicht einmal nötig zu sein, daß wenigstens ein elektrophoretischer Polymorphismus vorliegt, um Dodekamere zu bilden. Zumindest konnte Raeder (1984) aus einer elektrophoretisch und immunologisch völlig homogenen Untereinheit des Hämocyanins der Schwimmkrabbe CALLINECTES SAPIDUS Dodekamere reassoziieren, die im Elektronenmikroskop von nativen Dodekameren nicht zu unterscheiden waren.

Insofern müssen Überlegungen, wieviele Untereinheiten für den Aufbau eines Crustaceen-Dodekamers "gebraucht" werden spekulativ bleiben, zumal sich die Evolution von Dodekameren aus Hexameren mehrfach konvergent vollzogen zu haben scheint. Hierfür spricht die sehr unterschiedliche Stabilität der Inter-Hexamer-Brücke (Markl et al., 1981b). Diese ist z.B. bei HOMARUS durch die Calcium-Konzentration entscheidend beeinflussbar (Morimoto und Kegeles, 1971; Herskovits, 1983), während bei ASTACUS eine Disulfidbrücke vorliegt.

Zwar spielen nach meinen Ergebnissen auch bei Crustaceen-Hämocyaninen immunologisch unterscheidbare Bausteine spezifische Rollen in der Architektur der Oligomere, aber die Zahl der Bausteine ist nicht einheitlich: Die nativen Hexamere aus PALINURUS und EUPHAUSIA enthalten nur eine Untereinheit, diejenigen aus ASTACUS, PALAEMON UND PANULIRUS dagegen zwei. In den Dodekameren von GALATHEA, PAGURUS und OCYPODE ist immunologisch nur eine Untereinheit vorhanden, bei CANCER sind es zwei (plus dem defizienten Monomer 1), bei HOMARUS drei und bei ASTACUS drei plus eine defiziente Untereinheit (vgl. Tab.3, S.122).

Ein weiterer Faktor kompliziert das Bild zusätzlich, nämlich die Heterogenität auf dem Oligomerniveau. Das Vorkommen multipler Hexamere ist für CHERAX sowie für PANULIRUS dokumentiert (Jeffrey

et al., 1976; van den Berg et al., 1977). Auch das Dodekamer von CHERAX ist wahrscheinlich heterogen (Marlborough et al., 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde in der nativen PAGE eine Heterogenität der Hexamere von OCYPODE (4 Banden) sowie von ASTACUS (5 Banden) beobachtet. Sämtliche sonstigen Oligomere zeigten sich elektrophoretisch homogen. Zumindest bei ASTACUS und CHERAX geht das Auftreten multipler Hexamere auf das Vorhandensein immunologisch unterscheidbarer Monomere zurück; inwieweit dies einen funktionellen Hintergrund hat wurde noch nicht untersucht.

Die immunologisch distinkten Untereinheiten erfüllen vermutlich jeweils spezifische Aufgaben bei der Manifestation der typischen Sauerstoffbindungs-Charakteristik des Oligomers. Dies könnte eine bedeutende Triebfeder für die Evolution distinkter Untereinheiten sein. Mangels Daten ist der Einfluß dieses Aspekts auf die Zahl der vorhandenen Bausteine jedoch derzeit nicht abschätzbar.

4. Immunologische Verwandtschaftsanalysen

Die oben diskutierten Ergebnisse bezüglich der leichten Denaturierbarkeit der in Untereinheiten dissoziierten Crustaceen-Hämocyanine zeigen, daß bei dem vorliegenden Material eine Verwandtschaftsanalyse durch zweidimensionale Immunelektrophorese vorzuziehen war gegenüber quantitativen Methoden wie Mikrokomplementfixierung, Radioimmunoassay oder Enzymimmunoassay. Ein quantitatives Verfahren hätte zwar den Vorteil, daß auch lösliche Immunkomplexe erfaßt würden. Außerdem könnten Verwandtschaften auf wenige Prozent genau angegeben und nicht lediglich in die drei Kategorien "identisch", "partiell identisch", "nicht identisch" eingeordnet werden. Aber es würde kein Unterschied gemacht zwischen der nativen Untereinheit, einem eventuellen Reassoziat, dem denaturierten Anteil sowie Verunreinigungen durch andere Untereinheiten. Dies muß insgesamt zu einem erheblichen Fehler führen. Noch gravierender wäre dieser Fehler bei einem Vergleich von dissoziierten Gesamthämocyaninen, da in solchen Proben zusätzlich von Fall zu Fall noch oligomere Dissoziationsstufen sowie nichtrespiratorische Proteine vorhanden sein können. Insofern verwundert es nicht, daß die von Lamy 1982 beim EMBO-Symposium in Leeds vorgetragene Radioimmunoassay-Verwandtschafts-

analyse zahlreicher Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanine phylogenetisch nicht interpretierbar war und wohl aus diesem Grund nur auszugsweise im Symposiumsbericht veröffentlicht wurde (Lamy et al., 1983c).

Bei der Beurteilung der Verwandtschaft in der zweidimensionalen Immunelektrophorese spielt dagegen die Heterogenität des Materials keine Rolle, da alle Komponenten einzeln unterscheidbar sind. Insbesondere kann gut zwischen denaturiertem Protein und nativem Protein differenziert werden.

Der im folgenden diskutierte Stammbaum (Abb.43) basiert ausschließlich auf dem qualitativen Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Antigendeterminanten bzw. Untereinheitentypen. Auf die quantitative Abschätzung der Stärke der immunologischen Kreuzreaktionen mit dem Ziel, die Daten phylogenetisch zu verwerten wurde verzichtet, da Hämocyanin ohne Zweifel ein hochadaptives Molekül ist (vgl. Mangum, 1980). Die immunologischen Distanzen zwischen drei Hämocyaninen dürften daher nur in den seltensten Fällen die phylogenetischen Abstände zwischen den betreffenden Organismen widerspiegeln. Nach King und Wilson (1975) können die Evolutionsgeschwindigkeiten der Proteine eines Organismus und des Organismus selbst sehr stark differieren. Beispielsweise ist das Hämocyanin der Wolfspinne *CUPIENNIUS* mit dem der Vogelspinne *EURYPELMA* immunologisch nicht näher verwandt als mit dem Hämocyanin des Skorpions *ANDROCTONUS* (Markl et al., 1984), trotz der stammesgeschichtlichen Distanz zwischen Skorpionen und modernen Spinnen.

Bei allen von mir untersuchten Crustaceen-Hämocyaninen treten Untereinheiten auf, die mit den von Markl und Kempter (1981b) bei Krabben als phylogenetisch konservativ beschriebenen Polypeptidketten deutlich kreuzreagieren (vgl. Tab.3, S.122 und Abb.45, S.123). Lediglich bei *PALINURUS* war die immunologische Verwandtschaft nur sehr schwach ausgeprägt. Diese allen Hämocyaninen gemeinsame Komponente wurde von mir als alpha-Untereinheit bezeichnet. Die Hämocyanine der *Astacura*, *Palinura* und das von *PALAEMON* enthalten einen weiteren Untereinheitentyp, der delta genannt wurde. Bei Verwendung des homologen Antiserums konnte ich keine oder nur eine geringe Kreuzreaktion zwischen den alpha- und delta-Untereinheiten eines Hämocyanins erkennen.

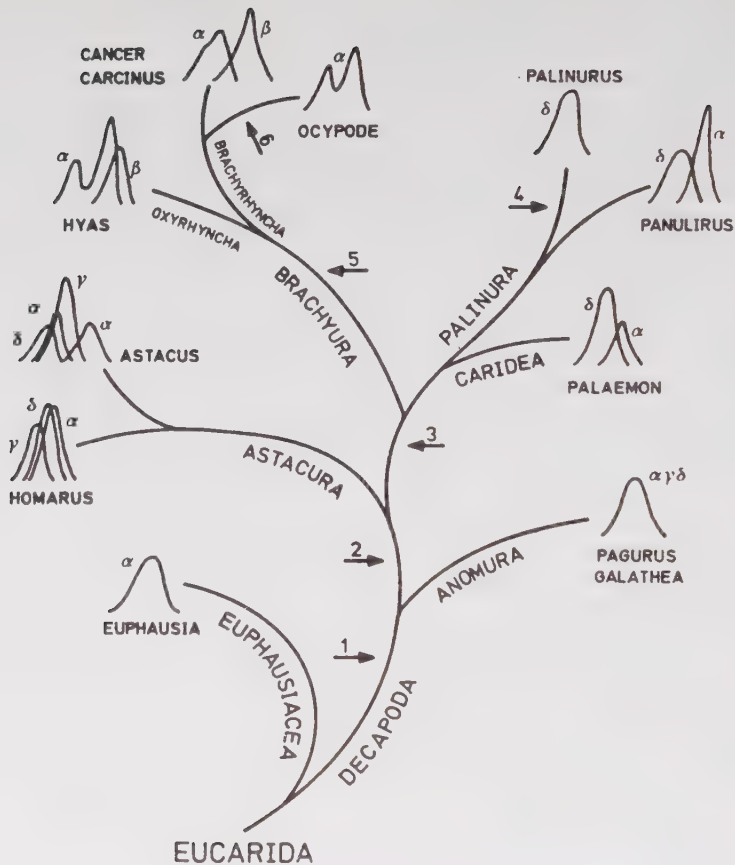


Abbildung 43:

Hypothetischer Stammbaum der eucariden Crustaceen aufgrund der immunologischen Verwandtschaft der Hämocyanin-Untereinheiten. Die Muster der zweidimensionalen Immunelektrophoresen der einzelnen Hämocyanine sind in Form von Skizzen eingefügt. Alpha, beta, gamma und delta entsprechen den immunologisch verschiedenen Untereinheiten-Typen der Hämocyanine. 1 = Evolution von gamma- und delta Determinanten auf einer alpha-Untereinheit. 2 = Verteilung von alpha-, gamma- und delta-Determinanten auf drei Untereinheiten infolge von Genduplikationen. 3 = Verlust der gamma-Untereinheit. 4 = Verlust der alpha-Untereinheit. 5 = Verlust der delta-Untereinheit und Neuentwicklung der beta-Untereinheit oder starke Abwandlung von delta in beta. 6 = Verlust von beta.

Dagegen zeigte sich bei Einsatz eines heterologen Antiserums eine deutliche Kreuzreaktion beider Komponenten, deren Klarheit mit der systematischen Distanz des Tieres wuchs, gegen dessen Hämocyanin das Antiserum gebildet worden war. In der Regel erschien mit einem heterologen Antiserum die Untereinheit delta eines Hämocyanins als immunologisch defizient gegenüber der Untereinheit alpha desselben Hämocyanins. So erkannte z.B. anti-CANCER alpha-Antiserum mehr Determinanten bei HOMARUS 4 als bei HOMARUS 1/2/3/5, demzufolge stufte ich HOMARUS 4 als alpha- und HOMARUS 1/2/3/5 als delta-Untereinheit ein. Die alpha-Untereinheiten dürften dem Urhämocyanin strukturell am nächsten stehen, da das Hämocyanin des antarktischen Krill ausschließlich aus alpha-Komponenten aufgebaut ist und Krill der einzige nichtdekapode und somit taxonomisch distanzierteste der von mir untersuchten Krebse war. Zudem wurde das EUPHAUSIA-Hämocyanin als einziges der hier untersuchten Crustaceen-Hämocyanine von anti-EURYPELMA (= Cheliceraten) Antiserum präzipitiert.

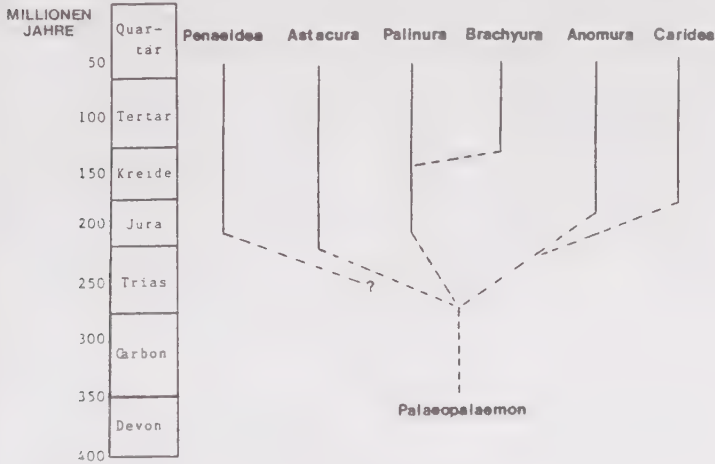


Abbildung 44:

Hypothetischer Stammbaum der dekapoden Malakostraken aufgrund morphologischer Daten (nach Schram, 1982). Die Unterordnung Natantia (Garnelen) ist hier durch die Penaeidea (Geißelgarnelen) und die Caridea (Eucyphidea) vertreten; die Garnelengruppe (Stenopodidea) blieb unberücksichtigt. Die Astacura, Palinura, Brachyura und Anomura gehören der zweiten Dekapoden-Unterordnung Reptantia an. Insbesondere die Abstammung der Penaeidea und Caridea (z.B. PALAEMON) ist durch Fossilfunde nur sehr dünn belegt. Weitgehend gesichert gilt dagegen die Abstammung der brachyuren Krabben von langustenartigen Formen. Der im Devon lebende PALAEO-PALAEMON weist sowohl garnelenartige als auch Astacurentypische Merkmale auf und wird deshalb als mögliche Stammform der dekapoden Krebse gewertet (Schram, 1982).

Die Evolution der delta-Untereinheit hat offenbar erst innerhalb der Dekapoda stattgefunden. Gegen die Möglichkeit, daß Vorfahren von EUPHAUSIA bereits über delta-Komponenten verfügten, die später wieder verloren gegangen sind, sprechen die Befunde bei GALATHEA und PAGURUS. Hier sind alpha- und delta-typische Merkmale auf einer einzigen Polypeptidkette lokalisiert. Darüberhinaus befinden sich auf dieser Kette Determinanten, die typisch für die dritte, als gamma bezeichnete Untereinheit der Astacura sind.

Hieraus ergeben sich zwei denkbare Evolutionsschemata:

(1) Die gamma- und delta-Determinanten bildeten sich zusätzlich auf einer urtümlichen alpha-Untereinheit aus, und die Anomuren-Hämocyane behielten diesen Hämocyanintyp bei. Später erfolgten Genduplikationen und die drei Determinantengruppen wurden im Verlauf der weiteren Evolution auf den Tochtergenen unterschiedlich erhalten.

(2) Die zweite Möglichkeit wäre eine Vervielfältigung des alpha-Gens mit anschließender unabhängiger Evolution, die auf einem Ast zu delta-Genen und auf einem anderen zu gamma-Genen führte, während ein dritter Ast alpha-typisch blieb. Allerdings wären dann die Verhältnisse bei den Anomuren nur durch eine Verschmelzung dreier Gene erklärbar. Solche Phänomene sind zwar beschrieben (z.B. Zappe et al., 1977), haben aber eine Längenvervielfachung der Polypeptidkette zur Folge. Selbst wenn man eine anschließende Serie von Deletionen impliziert wäre es sehr unwahrscheinlich, daß als Endergebnis eine im - für Hämocyane - normalen Größenrahmen liegende Polypeptidkette herauskäme, wie sie bei den Anomuren-Hämocyaninen tatsächlich vorliegt.

Insofern kann die zweite Möglichkeit m.E. ausgeschlossen werden, was gleichzeitig bedeutet, daß die Anomuren als Abteilung der Reptantia vor allen anderen von mir untersuchten Dekapoden vom Stammbaum abgezweigt sein müssen (Abb.43). Dies steht im Gegensatz zu den in Abb.44 gezeigten Stammbaum von Schram (1982), da hier die zu den Caridea gehörenden Palaemoniden in die Nähe der Anomuren gestellt werden. Auf Grund meiner Daten ist jedoch anzunehmen, daß es erst nach Abzweigung der Anomura zur Verteilung von alpha-, gamma- und delta-Determinanten auf drei verschiedene Polypeptidketten gekommen ist und anschließend zur Aufspaltung in die Gruppen Astacura, Palinura, Brachyura und Caridea (Abb.43).

Bei der amerikanischen Languste *PANULIRUS* dominieren die delta-Untereinheiten, wenngleich auch noch eine alpha-Untereinheit vorhanden ist. Diese ist bei der europäischen Languste *PALINURUS* vollständig reduziert; das gesamte Hämocyanin entspricht hier immunologisch der delta-Komponente. Dies belegt, daß sich in der Phylogenie der Dekapoden mindestens einmal die Eliminierung eines ganzen Kettentyps vollzogen hat. Ein ähnlicher Fall könnte bei *OCYPODE* vorliegen (siehe unten). Es ist insofern wahrscheinlich, daß solche Eliminierungen wiederholt geschahen. So dürfte einem gemeinsamen Vorfahren der *Brachyura*, *Palinura* und *Caridea* die gamma-Untereinheit verloren gegangen sein, die bei den *Astacura* erhalten geblieben ist. Das würde bedeuten, daß die drei ersteren untereinander näher verwandt sind als jede von ihnen mit den *Astacura* (Abb.43). Alternativ wäre ein zwei- oder dreimaliger konvergenter Verlust von gamma denkbar, was jedoch komplizierter ist und daher weniger zwingend erscheint. Auch ist eine nahe Verwandtschaft zwischen *Brachyura* und *Palinura* sowie eine distanziertere Stellung der *Astacura* fossil belegt; es gilt u.a. nach Schram (1982) als wahrscheinlich, daß sich die Krabben aus langustenartigen Vorfahren entwickelt haben (Abb.44).

Von den übrigen drei Gruppen ohne gamma-Untereinheit könnten sich die *Caridea* und die *Palinura* näherstehen, da beide noch die Komponenten alpha und delta besitzen. Die Stellung der *Caridea* in der Nähe der *Anomura* (Abb.44) wurde bereits weiter oben in Frage gestellt und ist fossil nur schwach belegt (Schram, 1982). Bezüglich der Herkunft dieser Gruppe der *Natantia* sollten die vorliegenden immunologischen Daten einen neuen Denkanstoß geben.

Bei den *Brachyura* ist die Untereinheit delta verschwunden und die neue Komponente beta aufgetaucht, die sich durch eine extrem hohe Evolutionsgeschwindigkeit auszeichnet und daher früher als variable Untereinheit bezeichnet wurde (Markl und Kempster, 1981b). Homologe Hyperimmunseren ließen eine schwache intraspezifische Verwandtschaft zwischen den alpha- und beta-Untereinheiten von *CANCER*, *CARCINUS* und *HYAS* erkennen (Kempster, 1979). Insofern ist wohl zumindest eine Herkunft der beta-Kette vom gamma-Typ auszuschließen, was in das hier vorgestellte Schema paßt (Abb.43), und es muß sich bei beta um eine stark abgewandelte Modifikation von alpha oder delta handeln. Das Hämocyanin aus *OCYPODE*

(Fam. Ocypodidae) enthält nach meinen Ergebnissen lediglich alpha-Untereinheiten, während die beta-Komponente nicht nur bei *CANCER* (Fam. Cancridae), sondern auch bei 6 Vertretern der Majidae und Portunidae gefunden wurde (Markl und Kempster, 1981a,b; Raeder, 1984). Dieser Befund kann auf verschiedene Weise interpretiert werden:

(1) OCYPODE könnte über einen ursprünglichen Hämocyanintyp verfügen, wobei zu fordern ist, daß die delta-Komponente eliminiert wurde und die beta-Untereinheit sich erst später durch Genduplikation aus der noch verbleibenden alpha-Untereinheit entwickelte. Trifft dies zu, so können die Majidae, Cancridae und Portunidae als gemeinsame Gruppe den Ocypodidae gegenübergestellt werden.

(2) Ebenso ist jedoch denkbar, daß die Situation bei OCYPODE durch Verlust einer früher vorhandenen beta-Komponente zustande gekommen ist. Die Evolution der beta-Kette könnte sich dennoch wie oben abgespielt haben, wobei lediglich OCYPODE an anderer Stelle im Stammbaum abzweigt (Abb.43).

Die zweite Möglichkeit erscheint m.E. wahrscheinlicher, denn nach Kaestner (1967) gehören die Krabbenfamilien Cancridae (*CANCER*), Portunidae (*CALLINECTES*) und Ocypodidae (*OCYPODE*) der Überfamilie Brachyrhyncha an, wogegen die Familie Majidae (*Maja*) der Überfamilie Oxyrhyncha zugeordnet wird. Da sowohl *MAJA SQUINADO* als auch *CANCER* und *CALLINECTES* alpha- und beta-Untereinheiten besitzen (Markl und Kempster, 1981a,b; Raeder, 1984) liegt der Schluß nahe, daß sich bei einem gemeinsamen Vorfahren beider Überfamilien bereits beta-Untereinheiten entwickelt hatten, die den Ocypodidae sekundär wieder verloren gingen.

Ob die beta-Kette eine abgewandelte delta-Untereinheit darstellt oder ob sie sich, wie unter (1) erläutert, nach der Eliminierung von delta direkt aus dem alpha-Typ entwickelt hat kann nicht entschieden werden.

Genaueren Aufschluß könnte eine breit angelegte vergleichend-immunologische Untersuchung der Hämocyanine aus Krabben bringen. Dies wäre zweifellos auch von phylogenetischem Interesse. Zudem stellen die brachyuren Krabben eine Tiergruppe dar, die durch adaptive Radiation eine Vielzahl unterschiedlicher Lebensräume erobern konnte. Aus diesem Grund wäre eine vergleichend funktionelle Studie der Hämocyanin-Untereinheiten vielversprechend.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. In der vorliegenden Arbeit wurden Hämocyane von zehn euca-
riden Crustaceen aus neun Familien elektrophoretisch, immuno-
logisch und elektronenmikroskopisch untersucht.
2. Die immunologisch unterscheidbaren Untereinheiten der einzel-
nen Hämocyane wurden isoliert und charakterisiert (Tab.3,
Abb.45). Dabei war auffallend, daß die Zahl elektrophoretisch
unterscheidbarer Komponenten stets höher war, als die Zahl
immunologisch distinkter Untereinheiten. Immunologisch waren
bei dodekameran Hämocyaninen zwischen 1 und 4 Untereinheiten
unterscheidbar; hexamere Hämocyane bestanden aus 1 bis 2
verschiedenen Komponenten. Bemerkenswert ist auch, daß be-
stimmte Untereinheiten der untersuchten Krebs-Hämocyane
relativ leicht denaturierten. Nach Denaturierung reagierten
die Untereinheiten eines Hämocyanins immunologisch identisch,
obwohl sie im nativen Zustand immunologisch heterogen waren.
3. Gegen die einzelnen Untereinheiten-Typen wurden spezifische
Antiseren hergestellt. Bei der interspezifischen Verwandt-
schaftsanalyse ließen sich die Untereinheiten 4 immunologisch
unterscheidbaren Gruppen zuordnen, die mit alpha, beta, gamma
und delta bezeichnet wurden. Die alpha-Untereinheiten kreuz-
reagieren mit Cheliceraten-Hämocyanin und treten in allen 9
Crustaceenfamilien auf. Sie stellen sicher den ursprünglich-
sten Untereinheiten-Typ dar. Delta-Untereinheiten können im
Gegensatz zu beta- und gamma-Untereinheiten intraspezifisch
mit alpha-Untereinheiten kreuzreagieren. Aufgrund der Verbrei-
tung der einzelnen Untereinheiten-Typen in den verschiedenen
Crustaceen-Gruppen wird ein Stammbaum vorgeschlagen.
4. Auf der Grundlage von Dissoziations- und Reassoziations-expe-
rimenten sowie immunelektronenmikroskopischer Daten wurde
für die 24S-Hämocyane aus ASTACUS, HOMARUS und CANCER die
topologische Struktur ermittelt. Für CANCER- und ASTACUS-
Hämocyanin wurde ein Modell der Quartärstruktur vorgestellt.
Demnach übernehmen in den Hämocyanin-Dodekameran alpha-Unte-
reinheiten die Verknüpfung der hexameren Halbstrukturen.

Tabelle 3:

Übersicht über die Untereinheiten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hämocyane:

In den Spalten stehen die immunologisch verwandten UE-Typen (alpha, beta, gamma und delta) untereinander. In den Zeilen sind die Untereinheiten der einzelnen Hämocyane nebeneinander gestellt. Die Nummerierung erfolgte nach der elektrophoretischen Mobilität der Untereinheiten: jede Zahl steht für eine Proteinbande (vgl. Kapitel Ergebnisse A.).

	alpha	beta	gamma	delta
ASTACUS	3-5		1	2
HOMARUS	4		6	1-3/5
CANCER	1-3	4		
OCYPODE	1-4			
PANULIRUS	80K			90K-94K
PALINURUS				1-4
GALATHEA	1-7		1-7	1-7
PAGURUS	1-9		1-9	1-9
PALAEMON	4/5			1-3
EUPHAUSIA	1-4			

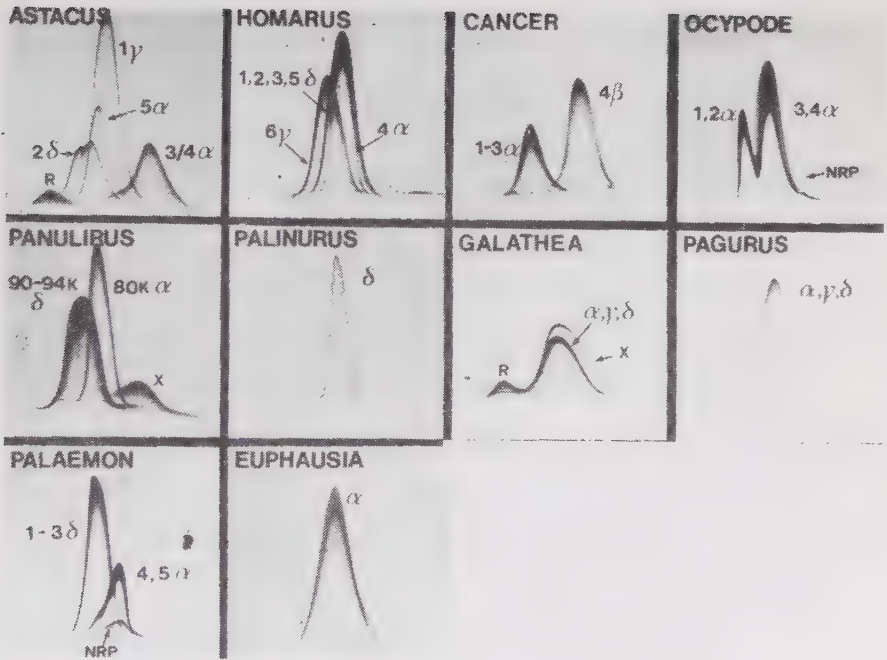


Abbildung 45:

Übersicht über die Gipfelmuster der zweidimensionalen IE der zehn untersuchten Crustaceen-Hämocyane:

Die Anode bei der 1.Dim. war links. Aufgetragen wurden jeweils die dissoziierten Hc's (mit Ausnahme von EUPHAUSIA, wo das 16S-Hc eingesetzt wurde). Für die 2.Dim. wurde das jeweils homologe Antiserum verwendet. Die immunologischen Komponenten wurden gemäß ihrer Zusammensetzung aus elektrophoretisch verschiedenen Untereinheiten mit arabischen Ziffern bezeichnet (vgl. Kap.A). Zusätzlich wurden die immunologisch korrelierten Komponenten mit griechischen Buchstaben belegt (vgl. Kap.B). X = denaturiertes Protein; R = undissoziiertes Hc; NRP = nichtrespiratorisches Protein.

L I T E R A T U R E

- Aebi U., Ten Heggeler B., Onorato L., Kistler L. & Showe M.K. (1977): New method for localizing proteins in periodic structures. Fab fragment labeling combined with image processing of electron micrographs. Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 74 , 5514-5518.
- Amkraut A.A., Malley A. & Begley D. (1969): Immunogenicity of hemocyanins and their subunits. J.Immunol. 103 , 1301-1310.
- Anderson T.F. & Stanley W.M. (1941): A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antibody. J.Mol.Chem. 139 , 339-344.
- Arisaka F. & Van Holde K.E. (1979): Allosteric properties and the association equilibria of the hemocyanin from CALLIANASSA CALIFORNIENSIS. J.Mol.Biol. 134 , 41-73.
- Arnheim N., Sobel J. & Canfield R. (1971): Immunochemical resemblance between human leukemia and hen egg-white lysozyme and their reduced carboxymethyl derivatives. J.Mol.Biol. 61 , 237-250.
- Axelsen N.H. & Bock E. (1973): Further studies on the reaction of partial identity in quantitative immunoelectrophoretic patterns. J.Imm.Meth. 2 , 393-401.
- Baty D. & Lazdunski C. (1979): An anti-(signal-peptide)-antibody: purification, properties and use as a conformational probe. Eur.J.Biochem. 102 , 503-507.
- Beltramini M. & Lerch K. (1983): The reconstitution reaction of NEUROSPORA apotyrosinase and CARCINUS apohemocyanin: A comparative study. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood E.J., ed.). Life Chem.Reports 1 , Harwood Acad.Publ., Chur-London-New York, pp.323-326.
- Bijlholt M.M.C., van Heel M.C. & van Bruggen E.F.J. (1982): Comparison of 4 x 6 -meric hemocyanins from three different arthropods using computer alignment and correspondence analysis. J.Mol.Biol. 161 , 139-153.
- Blair D. & Van Holde K.E. (1976): Sedimentation equilibrium studies of a complex association reaction. Biophys.Chem. 5 , 165-170.
- Bock E. & Axelsen N.H. (1972): The reaction of partial identity in quantitative immunoelectrophoretic patterns. J.Imm.Meth. 2 , 75-87.
- Bonaventura J., Brunori M., Wilson M.T., Martin J., Garlick R.L. & Davis B.J. (1979): Properties of hemocyanins isolated from Amazon River arthropods and molluscs. Comp.Biochem.Physiol. 62A , 251-256.

- Boyden A.A. (1942): Systematic serology: a critical appreciation. *Physiol.Zool.* 15 , 109.
- Bramhall S., Noak N., Wu M. & Loewenburg J.R. (1969): A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal.Biochem.* 31 , 146-148.
- Brenner S. & Horne R.W. (1959): A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim.Biophys.Acta* 34 , 103-110.
- Brenowitz M. (1982): The role of structural distinct subunits in the function and assembly of LIMULUS POLYPHEMUS hemocyanin. Diss., Duke Univ., Durham, USA.
- Brenowitz M., Bonaventura C., Bonaventura J. & Gianazza E. (1981): Subunit composition of a high molecular weight oligomer: LIMULUS POLYPHEMUS hemocyanin. *Arch.Biochem.Biophys.* 210 , 748-76.
- Bridges Ch., Savel A., Stöcker W., Markl J. & Linzen B. (1983): Structure and function of Krill (EUPHAUSIA SUPERBA) haemocyanin: Adaption to life at low temperature. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood E.J., ed.). *Life Cem. Reports* 1 , Harwood Acad. Publ. Chur-London-New York, pp.353-356.
- Brouwer M., Bonaventura C. & Bonaventura J. (1978): Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp, PENAEUS SETIFERUS. *Biochemistry* 17 , 2148-2154.
- Burnett L.E. (1979): The respiratory function of hemocyanin in the spider crab, LIBINIA EMARGINATA, and the ghost crab, OCYPODE QUADRATA in normoxia and hypoxia. *J.Exp.Zool.* 210 , 289-300.
- Busselen P. (1970): The electrophoretic heterogeneity of CARCINUS MAENAS hemocyanin. *Arch.Biochem.Biophys.* 137 , 415-420.
- Cameron J.N. (1978): Effects of hypercapnia on blood acid-base status, NaCl-fluxes and trans-gill potential in freshwater blue crabs, CALLINECTES SAPIDUS. *J.Comp.Physiol.* 123 , 137-141.
- Carpenter D.E. & Van Holde K.E. (1973): Amino acid composition, amino-terminal analysis and subunit structure of CANCER MAGISTER hemocyanin. *Biochemistry* 12 , 2231.
- Chantler E.N., Harris R.R. & Bannister W.H. (1973): Oxygenation and aggregation properties of haemocyanin from CARCINUS MEDITERRANEUS and POTAMON EDULIS. *Comp.Biochem.Physiol.* 46A , 333-343.
- Chase M.W. (1967): Animal handling. *Meth.Imm.Immunochem.I* (Williams C.A. & Chase M.W., eds.). New York.

- Chervenka C.H. (1973): A manual of methods for the analytical ultracentrifuge. Spinco Division of Beckman Instruments, Palo Alto, Cal.94304, USA.
- Crumpton M.J. (1974): Protein antigens. In: The antigens (Sela M., ed.). Academic Press, Oxford.
- Decker H. (1981): Zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne EURYPELMA CALIFORNICUM. Diss.Univ.München.
- Decker H., Schmid R., Markl J. & Linzen B. (1980): Hemocyanins in spiders, XII: Dissoziation and reassembly of EURYPELMA hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 1707-1717.
- Dickerson R.E. (1971): The structure of cytochrome C and the rates of molecular evolution. J.Mol.Evol. 1, 26-45.
- di Giamberardino L. (1967): Dissociation of ERIPHIA hemocyanin. Arch.Biochem.Biophys. 118, 273-278.
- Elias H.G. (1969): Ultrazentrifugen Methoden. Beckman Instruments GmbH, München.
- Ellerton H.D. & Anderson D.M. (1981): Subunit structure of the hemocyanin from the prawn PENAEUS MONODON. In: Invertebrate oxygen binding proteins. Structure, active site and function (Lamy J. & Lamy J., eds.) Marcel Dekker, New York, pp.159-170.
- Ellerton H.D., Carpenter D.E. & Van Holde K.E. (1970): Physical studies of hemocyanins. V. Characterization and subunit structure of the hemocyanin of CANCER MAGISTER. Biochemistry 9, 2225-2232.
- Ellerton H.D., Collins L.B., Gale J.S. & Yung A.Y.P. (1977): The subunit structure of the hemocyanin from the crayfish JASUS EDWARDSII. Biophys.Chem. 6, 47-57.
- Ellerton H.D., Ellerton N.F. & Robinson H.A. (1983): Hemocyanin - a current perspective. Progr.Biophys.Mol.Biol. 41, 143-258.
- Elwing H., Nilsson L.-A. & Ouchterlony Ö. (1977): A simple spot technique for thin layer immunoassays (TIA) on plastic surfaces. J.Imm.Meth. 17, 131-145.
- Erhardt A. (1929): Der Wert der Immunitätsreaktionen für phylogenetische Untersuchungen in der Zoologie. Z.Immunitätsforschung 60, 156.
- Eriksson-Quensel J.B. & Svedberg T. (1936): The Molecular weights and pH stability regions of the hemocyanins. Biol.Bull.Mar.Biol.Lab. Woods Hole 71, 498-54.
- Fernandez-Moran H., van Bruggen E.F.J. & Ohtsuki M. (1966): Macromolecular organization of hemocyanins and apo-hemocyanins as revealed by electron microscopy. J.Mol.Biol. 16, 191-207.

- Folkerts A. & van Eerd J.P. (1981): Immunological relatedness of five hemocyanin subunits from the spiny lobster PANULIRUS INTERRUPTUS. In: Invertebrate oxygen binding proteins. Structure, active site and function (Lamy J. & Lamy J., eds.). Marcel Dekker, New York, pp.215-225.
- Gaykema W.P.J., Groendijk H., Dorten G., Vereijken J.M. & Hol W.G.J. (1983): Crystals containing a single subunit type of PANULIRUS INTERRUPTUS hemocyanin. *J.Mol.Biol.* 168 , 1.
- Gaykema W.P.J., Hol W.G.J., van Schaick E.J.M. & Schutter N.G. (1983): The crystal structure of the hemocyanin hexamer from PANULIRUS INTERRUPTUS at 4Å resolution. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood E.J., ed.). *Life Chem. Reports* 1 , Harwood Acad. Publ., Chur-London-New York, pp.57-60.
- Gondko R. & Michalak W. (1981): Some physicochemical properties of hemocyanin of crayfish. In: Invertebrate oxygen binding proteins. Structure, active site and function (Lamy J. & Lamy J., eds.), Marcel Dekker, New York, pp.41-47.
- Goodwin T.W. (1960): Biochemistry of pigments. In: The physiology of Crustacea 1 , Acad.Press, New York, pp.101-140.
- Grabar P. & Williams C.A. (1953): Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange des protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim.Biophys.Acta* 10 , 193.
- Groß B. (1982): Untersuchungen zur Alterung des nativen und dissoziierten Hämocyanins der Vogelspinne EURYPELMA CALIFORNICUM. Zulassungsarbeit, Universität München.
- Grubb A. (1972): Analysis of the immunochemical relationship between antigens by electrophoresis in agarose gels containing antibodies. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 29 , Suppl.124, 59-65.
- Hall J.L. & Rowlands D.T., Jr. (1974): Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. *Biochemistry* 13 , 821.
- Hamlin L.M. & Fish W.E. (1977): The subunit characterization of CALLINECTES SAPIDUS hemocyanin. *Biochim.Biophys.Acta* 491 , 46-52.
- Hedrick J.L. & Smith A.J. (1968): Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch.Biochem.Biophys.* 126 , 155-164.
- Heidelberger M. & Kendall F.E. (1935): The precipitation reaction between type III PNEUMOCOCCUS polysaccharide and homologous antibody. III. A quantitative study and a theory of the reaction mechanism. *J.Exp.Med.* 61 , 563.
- Herskovits T.T., Carberry S.E. & San George R.C. (1983): Subunit structure and dissociation of HOMARUS AMERICANUS hemocyanin. Effects of salts and ureas on the acetylated and unmodified hexamers. *Biochemistry* 22 , No. 17.

- Herskovits T.T., Erhunmwunsee L.J., San George R.C. & Herp A. (1981): Subunit structure and dissociation of CALLINECTES SAPIDUS hemocyanin. *Biochim.Biophys.Acta* 667 , 44-58.
- Jaccarini V. & Harris R.R. (1975): An immunological comparison of hemocyanins from geographically isolated populations of some Brachyura (decapoda). *Comp.Biochem.Physiol.* 50A , 729-731.
- Jeffrey P.D. & Treacy G.B. (1982): The molecular weights of hemocyanin subunits. A brief survey with special reference to CHERAX DESTRUCTOR hemocyanin. *Comp.Biochem.Physiol.* 73B , No.4, 983-990.
- Jeffrey P.D. (1979): Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish CHERAX DESTRUCTOR. Electron microscopy of native and reassembled molecules. *Biochemistry* 18 , 2508-2513.
- Jeffrey P.D., Lamy J., Lamy J., Leclerc M. & Marlborough D. (1981): Immunochemical properties of CHERAX DESTRUCTOR hemocyanin. In: *Invertebrate oxygen binding proteins. Structure, active site and function* (Lamy J. & Lamy J., eds.), Marcel Dekker, New York, pp.227-238.
- Jeffrey P.D., Shaw D.C. & Treacy G.B. (1976): Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish CHERAX DESTRUCTOR. Studies of two different monomers and their participation in the formation of multiple hexamers. *Biochemistry* 15 , 5527-5533.
- Jeffrey P.D., Shaw D.C. & Treacy G.B. (1978): Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish CHERAX DESTRUCTOR. Characterization of a dimeric subunit and its involvement in the formation of the 24S-component. *Biochemistry* 17 , 3078.
- Johnson B. (1984): Dissertation, Duke University Beaufort (USA), in Vorbereitung.
- Johnson G. & Garvey J.S. (1977): Improved method for separation and purification by affinity chromatography. *J.Imm.Meth.* 15 , 29-37.
- Johnston W., James T.W. & Barber A.A. (1967): Oxygen binding characteristics of lobster hemocyanin and its subunits. *Comp.Biochem.Physiol.* 22 , 261-272.
- Jolles J, Jolles P., Lamy J. & Lamy J. (1979): Structural characterization of seven different subunits in ANDROCTONUS AUSTRALIS hemocyanin. *Febs Letters* 106 , 289-291.
- Joubert F.J. (1954): Hemocyanin of the crawfish JASUS LALANDII. *Biochim.Biophys.Acta* 14 , 127-135.
- Kaestner A. (1967): *Lehrbuch der speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose, 2.Teil: Crustacea, 2.Aufl.*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Kahn R. & Rubin R.W. (1975): Quantitation of submicrogram amounts of proteins using coomassie brilliant blue R on sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide slab gels. *Anal.Biochem.* 67 , 347-352.

- Kekwick R.A. (1940): The serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem.J.* 34 , 1248-1249.
- Kempton B. (1979): Immunologische Untersuchungen zur Verwandtschaft der Untereinheiten von Crustaceen-Hämocyaninen. Diplomarbeit, Universität München.
- Kempton B. (1983): Die Anwendung spezifischer Antikörper zur Untersuchung eines Spinnen-Hämocyanins: Quartärstruktur, Verwandtschaftsbeziehungen, Biosyntheseort. Diss., Universität München.
- Kimura M. (1983): The neutral theory of molecular evolution. In: *Evolution of genes and proteins* (Nei M. & Koehn R.K., eds.), Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Mass., pp.208-233.
- King M.C. & Wilson A.C. (1975): Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188 , 107.
- Klarman A. & Daniel E. (1977): Built-in cooperativity of oxygen binding by arthropod hemocyanins. *J.Mol.Biol.* 115 , 257-261.
- Klarman A. & Daniel E. (1981): Structural basis of subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. *Comp.Biochem.Physiol.* 70B , 115-123.
- Klarman A., Gottlieb J. & Daniel E. (1979): Quaternary structure and arrangement of subunits in hemocyanin from the scorpion *LEIRUS QUINQUESTRIATUS*. *Biochemistry* 18 , No.11, 2239-2244
- Kroll J. (1973): Crossed-line immunoelectrophoresis. *Scand.J.Immunol.* 2 , Suppl.1, 79-81.
- Kroll J. (1973): Tandem-crossed immunoelectrophoresis. *Scand.J.Immunol.* 2 , Suppl.1, 57-59.
- Kuiper H.A., Gaastra W., Beintema J.J., van Bruggen E.F.J., Shepman M.H. & Drenth J. (1975): Subunit composition, X-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of *PANULIRUS INTERRUPTUS* hemocyanin. *J.Mol.Biol.* 99 , 619-629.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 , 680-685.
- Lake J.A. (1978): Three dimensional mapping of ribosomal proteins using antibody labels. In: *Advanced techniques in biological electron microscopy* (Koehler J.K., ed.) 2 , Springer, Berlin, 173-211.
- Lamy J.N. (1983): Structure and evolution of hemocyanins. In: *Structure and function of invertebrate respiratory proteins* (Wood E.J., ed.). *Life Chem. Reports* 1 , Harwood Acad. Publ., Chur-London-New York, pp.15-26.
- Lamy J., Lamy J. & Weill J. (1979a): Arthropod hemocyanin structure: Isolation of eight subunits in the scorpion. *Arch.Biochem.Biophys.* 193 , 140-149.

- Lamy J., Lamy J., Weill J., Bonaventura J., Bonaventura J. & Brenowitz M. (1979b): Immunological correlates between the multiple hemocyanin subunits of LIMULUS POLYPHEMUS and TACHYPLEUS TRIDENTATUS. Arch.Biochem.Biophys. 196 , 324-339.
- Lamy J., Lamy J., Weill J., Markl J., Schneider H.-J. & Linzen B. (1979c): Hemocyanins in spiders, VII. Immunological comparison of the subunits of EURYPELMA CALIFORNICUM hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 360 , 889-895.
- Lamy J., Lamy J., Leclerc M., Compin S., Sizaret P.-Y. & Weill J. (1981a): Immunochemistry: A powerful tool in research on hemocyanin structure. In: Invertebrate oxygen binding proteins. Structure, active site and function (Lamy J. & Lamy J., eds.). Marcel Dekker, New York, pp.181-195.
- Lamy J., Bijlholt M.M.C., Sizaret P.-Y., Lamy J. & van Bruggen E.F.J. (1981b): Quaternary structure of scorpion (ANDROCTONUS AUSTRALIS) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy. Biochemistry 20 , 1849-1856.
- Lamy J., Sizaret P.-Y., Frank J., Verschoor A., Feldmann R. & Bonaventura J. (1982): Architecture of LIMULUS POLYPHEMUS hemocyanin. Amer.Chem.Soc. 21 , 6825-6833.
- Lamy J., Lamy J., Sizaret P.-Y., Billiald P., Jolles P., Jolles J., Feldman R.J. & Bonaventura J. (1983a): Quaternary structure of LIMULUS POLYPHEMUS hemocyanin. Biochemistry 22 , 5573-5583.
- Lamy J., Compin S. & Lamy J. (1983b): Immunological correlates between multiple isolated subunits of ANDROCTONUS AUSTRALIS and LIMULUS POLYPHEMUS hemocyanins: an evolutionary approach. Arch.Biochem.Biophys. 223 , 584-603.
- Lamy J., Leclerc M., Cisse A., Bonaventura J. & Bonaventura C. (1983c): Preliminary results on possible immunological relatedness between molluscan and arthropodan hemocyanins. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood E.J., ed.). Life Chem. Reports 1 , Harwood Acad.Publ., Chur-London-New York, pp.143-146.
- Larson B.A., Terwilliger N.B. & Terwilliger R.C. (1981): Subunit heterogeneity of CANCER MAGISTER hemocyanin. Biochim.Biophys.Acta 667 , 294-302.
- Lauffer M. & Swaby L.G. (1955): The size, shape, and hydration of lobster hemocyanin. Biol.Bull.Mar.Biol.Lab. Woods Hole 108 , 290-295.
- Laurell C.-B. (1965): Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal.Biochem. 10 , 358.
- Leone C.A. (1949): Comparative serology of some brachyuran Crustacea and studies in hemocyanin correspondence. Biol.Bull. 97 , 273-282.

- Leone C.A. (1950a): Serological relationship among common brachyuran Crustacea of Europe. *Pubbl.Staz.Zool.Napoli* 22 , 273-282.
- Leone C.A. (1950b): Serological systematics of some palinuran and astacuran Crustacea. *Biol.Bull.* 98 , 122-127.
- Leone C.A. (1956): Immunochemical studies with hemocyanin. *Fed.Proc.* 15 , 598-599.
- Lienemann L.J. (1938): The green glands as a mechanism for osmotic and ionic regulation in the crayfish (CAMBARUS CLARKII Girard). *J.Cell.Comp.Physiol.* 11 , 149-159.
- Linzen B. (1983): Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood E.J., ed.). *Life Chem. Reports* 1 , Harwood Acad. Publ., Chur-London-New York, pp.27-38.
- Loehr J.S. & Mason H.S. (1973): Dimorphism of CANCER MAGISTER hemocyanin subunit. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 51 , 741-745.
- Loewe R. & Linzen B. (1973): Hemocyanins in spiders I. Subunits and stability region of DUGESIELLA CALIFORNICUM hemocyanin. *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.* 354 , 182-188.
- Loft H. (1975): Identification of human serum proteins by polyacrylamide gel electrophoresis combined with quantitative methods. *Scand.J.Imm.* 1 , 115-119.
- Mangum Ch.P. (1980): The respiratory function of hemocyanins. *Am.Zoologist* 20 , 19-38.
- Mangum Ch.P. (1983): Oxygen transport in the blood. In: The biology of the Crustacea (Bliss D.E. & Mantel L.H., eds.) 5 , Acad.Press.
- Manwell C. (1960): Heme-heme interactions in the oxygen equilibrium of some invertebrate myoglobins. *Arch.Biochem.Biophys.* 89 , 194-201.
- March S.C., Patikh J. & Cuatrecasas P. (1974): A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal.Biochem.* 60 , 149-152.
- Markl J. (1980): Hemocyanins in spiders, XI. The quaternary structure of CUPIENNIUS hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 140 , 199-207.
- Markl J., Markl A., Schartau W. & Linzen B. (1979a): Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: I. Chelicerata. *J.Comp.Physiol.* 130 , 283-292.
- Markl J., Hofer A., Bauer G., Markl A., Kempter B., Brenzinger M. & Linzen B. (1979b): Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: II. Crustacea. *J.Comp.Physiol.* 133 , 167-175.

- Markl J., Strych W., Schartau W., Schneider H.-J., Schöberl P. & Linzen B. (1979c): Hemocyanins in spiders, VI. Comparison of the polypeptide chains of EURYPELMA CALIFORNICUM hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 360 , 639-650.
- Markl J., Savel A. & Linzen B. (1980): Hemocyanins in spiders, IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of EURYPELMA CALIFORNICUM hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361 , 649-660.
- Markl J. & Kempter B. (1981a): Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immunoelectrophoresis. J.Comp.Physiol. 141 , 495-502.
- Markl J. & Kempter B. (1981b): Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. In: Invertebrate oxygen-binding proteins. Structure, active site, and function (Lamy J. & Lamy J., eds.). Marcel Dekker, New York, pp.125-137.
- Markl J., Kempter B., Linzen B., Bijlholt M.M.C & van Bruggen E.F.J. (1981a): Hemocyanins in spiders, XVI. Subunit topography and a model of quaternary structure of EURYPELMA hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362 , 1631-1641.
- Markl J., Decker H., Stöcker W., Savel A., Linzen B., Schutter W.G. & van Bruggen E.F.J. (1981b): On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 362 , 185-188.
- Markl J., Savel A., Linzen B. (1981c): Hemocyanins in spiders, XIV. Subunit composition of dissociation intermediates and its bearing on quaternary structure of EURYPELMA hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362 , 1255-1262.
- Markl J., Decker H., Linzen B., Schutter W.G. & van Bruggen E.F.J. (1982): Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the assembly of EURYPELMA hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363 , 73-87.
- Markl J., Stöcker W., Runzler R., Kempter B., Bijlholt M.M.C & van Bruggen E.F.J. (1983): Subunit heterogeneity, quaternary structure and immunological relationship of arthropod hemocyanins. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (E.J.Wood, ed.). Life Chem. Reports 1 , Harwood Acad. Publ., Chur-London-New York, pp.39-42.
- Markl J., Gebauer W., Runzler R. & Avissar I. (1984): Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits: I. Scorpion (LEIURUS, ANDROCTONUS) and spider (EURYPELMA, CUPIENNIUS) hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 365 , 619-631.
- Marlborough D.J., Jeffrey P.D. & Treacy G.B. (1981): Aggregation patterns in CHERAX DESTRUCTOR hemocyanin: Control of oligomer distribution by incorporation of specific subunits. Biochemistry 20 , 4816-4821.
- Maurer H.R. (1968): Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter, Berlin.

- Miller K.J., Eldred N.W., Arisaka F. & Van Holde K.E. (1977): Structure and function of hemocyanin from thalassinid shrimp. *J.Comp.Physiol.* 115B , 171-184.
- Morimoto K. & Kegeles G. (1971): Subunit interactions of lobster hemocyanin. I. Ultracentrifuge studies. *Arch.Biochem.Biophys.* 142 , 247.
- Murray A.C. & Jeffrey P.D. (1974): Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish *CHERAX DESTRUCTOR*. Subunit heterogeneity. *Biochemistry* 13 , 3667.
- Nahke P. (1984): Strukturchemische Untersuchungen an Untereinheiten des Hämocyanins der Vogelspinne *EURYPELMA CALIFORNICUM*. Dissertation, Universität München.
- Nei M. (1983): Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In: Evolution of genes and proteins (Nei M. & Koehn R.K., eds.), Sinauer Assoc.Inc., Sunderland,Mass., pp.165-190.
- Nisonoff A., Reichlin M. & Margoliash E. (1970): Immunological activity of cytochrome C. II. Localization of a major antigenic determinant of human cytochrome C. *J.Biol.Chem* 245 , 940-946.
- Nutall G.H.F. (1902): Progress report upon the biological test for blood as applied to over 500 bloods from various sources together with a preliminary note upon a method for measuring the degree of reaction. *British Med.J.*, Marburg 1 , 825.
- Ouchterlony Ö. (1958): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr.Allergy* 5 , 1-78.
- Pickett S.M., Riggs A.F. & Larimer J.L. (1966): Lobster hemocyanin: Properties of the minimum functional subunit and of aggregates. *Science* 151 , 1005-1007.
- Pilz J., Goral K., Hoylaerts M., Witters R. & Lontie R. (1980): Studies by small-angle X-ray scattering of the quaternary structure of the 24S-component of the hemocyanin of *ASTACUS LEPTODACTYLUS* in solution. *Biochemistry* 105 , 539-543.
- Porter R.R. (1959): The hydrolysis of rabbit-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem.J.* 73 , 119-126.
- Prager E.M. & Wilson A.C. (1971): The dependence of immunological cross-reactivity upon the sequence resemblance among lysozymes. *J.Biol.Chem.* 246 , 1010-1017.
- Raeder U. (1984): Die Untereinheitenzusammensetzung des Hämocyanins aus *CALLINECTES SAPIDUS* und einiger anderer brachyurer Krabben. Zulassungsarbeit, Universität München.
- Redmond J.R. (1968): The respiratory functions of hemocyanin. In: Physiology and biochemistry of hemocyanin (Ghiretti F., ed.), Acad.Press, New York, pp.5-23.

- Reichlin M., Nisonoff A. & Margoliash E. (1970): Immunological activity of cytochrome C. III. Enhancement of antibody detection and immune response initiation by cytochrome C polymers. *J.Biol.Chem.* 245 , 947-954.
- Reichlin M., Bucci E., Wyman J., Antonini E. & Rossi-Fanelli A. (1964): The immunological difference between oxy- and deoxyhemoglobin. *J.Mol.Biol.* 9 , 785-788.
- Ricchelli F., Filippi B. & Salvato B. (1981): Effect of sulfate ions on the denaturation of CARCINUS MAENAS hemocyanin induced by urea. In: *Invertebrate oxygen binding proteins: Structure, active site and function* (Lamy J. & Lamy J., eds.), Marcel Dekker, New York, pp.31-40.
- Robinson H.A. & Ellerton H.D. (1977): Heterogeneous subunits of the hemocyanins from JASUS EDWARDSII and OVALIPES CATHARUS. In: *Structure and function of haemocyanin* (Bannister J.V., ed.), pp.55-70, Springer Verlag, Berlin.
- Rochu D. & Fine J.M. (1978): Antigenic structure of the hemocyanin in six species of decapod Crustacea. *Comp.Biochem.Physiol.* 59A , 145-150.
- Rochu D. & Fine J.M. (1980): CANCER PAGURUS hemocyanin: Elektrophoretic and antigenic heterogeneity of the monomeric subunits. *Comp.Biochem.Physiol.* 66B , 273-278.
- Rochu D., Lambin P., Ghidalia W. & Fine J.M. (1978): Hemocyanin subunits and their polymeric forms in some decapod Crustacea. *Comp.Biochem.Physiol.* 59B , 117-122.
- Roxby R., Miller K., Blair D.P. & Van Holde K.E. (1974): Subunits and association equilibria of CALLIANASSA CALIFORNIENSIS hemocyanin. *Biochemistry* 13 , 1662.
- Salvato B., Beltramini M., Ricchelli R. & Tallandini L. (1981): The reaction between CARCINUS MAENAS hemocyanin and cyanide. In: *Invertebrate oxygen binding proteins: Structure, active site and function* (Lamy J. & Lamy J., eds.), Marcel Dekker, New York, pp.633-643.
- Schartau W., Eyerle F., Reisinger P., Geisert H., Storz H. & Linzen B. (1983): Hemocyanins in spiders, XIX. Complete amino-acid sequence of subunit d from EURYPELMA CALIFORNICUM hemocyanin, and comparison to chain e. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 364 , 1383-1409.
- Schram F.R. (1982): The fossil record and evolution of Crustacea. In: *The biology of the Crustacea* 1 , (Abele L.G., ed.), Acad.Press, New York, pp.93-147.
- Schneider H.-J. (1978): Über die Heterogenität der Untereinheiten des Hämocyanins aus der Vogelspinne EURYPELMA CALIFORNICUM. Dissertation, Universität München.

- Schneider H.-J., Drexel R., Feldmaier G., Linzen B., Lottspeich F. & Henschen A. (1983): Hemocyanins in spiders, XVIII. Complete amino-acid sequence of subunit e from EURYPELMA CALIFORNICUM hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364 , 1357-1381.
- Schneider H.-J., Markl J., Schartau W. & Linzen B. (1977): Hemocyanins in spiders, IV. Subunit heterogeneity in EURYPELMA (DUGESIELLA) hemocyanin, and separation of polypeptide chains. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358 , 1133-1141.
- Schneider H.-J., Schartau W., Linzen B., Lottspeich F. & Henschen A. (1980): Hemocyanins in spiders, X. Limited proteolysis of chain e of EURYPELMA hemocyanin and partial sequence of two large fragments. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361 , 1211-1216.
- Selander R.K. (1976): Genetic variations in natural populations. In: Molecular evolution (Ayala F.J., ed.). Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Mass..
- Senkbeil E.G. & Wriston J.C.jr. (1981): Catabolism of hemocyanin in the American lobster HOMARUS AMERICANUS. Comp.Biochem.Physiol. 69B , 781.
- Siezen R.J. & van Bruggen E.F.J. (1974): Structure and properties of hemocyanins. XII. Electronmicroscopy of dissociation products of HELIX POMATIA alpha hemocyanin: Quaternary structure. J.Mol.Biol. 96 , 77-80.
- Sizaret P.-Y., Frank J., Lamy J., Weill J. & Lamy J.N. (1982): A refined quaternary structure of ANDROCTONUS AUSTRALIS hemocyanin. Eur.J.Biochem. 127 , 501-506.
- Stöffler G., Bald R., Kastner B., Luhrmann R., Stöffler M. & Tischendorf G. (1980): Structural organization of ESCHERICHIA COLI ribosome and localization of functional domains. In: Ribosomes; structure, function and genetics (Chamliiss, Craven, Davies, Kahan & Nomura, eds.), Baltimore, pp.171-205.
- Sullivan B., Bonaventura J., Bonaventura C. & Godette G. (1976): Hemocyanin of the horseshoe crab, LIMULUS POLYPHEMUS. Structural differentiation of the isolated components. J.Biol.Chem. 251 , 7644-7648.
- Svedberg T. & Hedenius A. (1934): The sedimentation constants of the respiratory proteins. Biol.Bull. 65 , 191-223.
- Svedberg T. (1933): Sedimentation constants, molecular weights, and isoelectric points of the respiratory proteins. J.Biol.Chem. 103 , 311.
- Svendsen P.J. (1973): Fused rocket immunoelectrophoresis. Scand.J.Imm. 2 , Suppl.), 69-70.
- Tai M.-S. & Kegeles G. (1971): Subunit interactions of lobster hemocyanin. II. Temperature-jump studies. Arch.Biochem.Biophys. 142 , 258-267.

- Terwilliger N.B. (1982): Effect of subunit composition on quaternary structure of isopod (*LIGIA PALLASII*) hemocyanin. *Biochemistry* 21 , 2579.
- Terwilliger N.B., Terwilliger R.C., Applestein M., Bonaventura C. & Bonaventura J. (1979): Subunit structure and oxygen binding by hemocyanin of the isopod *LIGIA EXOTICA*. *Biochemistry* 18 , 102-108.
- van Bruggen E.F.J. (1983): An electron microscopist's view of the quaternary structure of arthropodan and molluscan hemocyanins. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood E.J., ed.). *Life Chem.Reports* 1 , Harwood Acad. Publ., Chur-London-New York, pp.1-14.
- van Bruggen E.F.J. & Fernandez-Moran H. (1966): Reassociation of hemocyanins from subunit mixtures. *J.Mol.Biol.* 16 , 208-2
- van Bruggen E.F.J., Bijlholt M.M.C., Schutter W.G., Wichertjes T., Bonaventura J., Bonaventura C., Lamy J., Lamy J., Leclerc M., Schneider H.-J., Markl J. & Linzen B. (1980): The role of structurally diverse subunits in the assembly of three Cheliceratan hemocyanins. *FEBS Letters* 116 , 207-210.
- van Bruggen E.F.J., Schutter W.G., van Breemen J.F.L., Bijlholt M.M.C. & Wichertjes T. (1981): The hemocyanins. In: *Electronmicroscopy of proteins* (Harris J.R.,ed.) 1 , Acad.Press, pp.1-38.
- van den Berg A.A., Gaastra W. & Kuiper H. (1977): Heterogeneity of *PANULIRUS INTERRUPTUS* hemocyanin. In: Structure and function of haemocyanins (Bannister J.V., ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.6-12.
- van Eerd J.P. & Folkerts A. (1981): Isolation of five subunits of the hemocyanin from the spiny lobster *PANULIRUS INTERRUPTUS*. In: *Invertebrate oxygen binding proteins: Structure, active site and function* (Lamy J. & Lamy J., eds.). Marcel Dekker, New York, pp.139-149.
- Van Holde K.E. & Brenowitz M. (1981): Subunit structure and physical properties of the hemocyanin of the giant isopod *BATHYNOMUS GIGANTEUS*. *Biochemistry* 20 , 5232-5239.
- Van Holde K.E. & Miller K.J. (1982): Haemocyanins. *Quart.Rev.Biophys.* 15 , No.1, 1-129.
- Van Holde K.E. & van Bruggen E.F.J. (1971): The hemocyanins. In: *Biological macromolecules* 5 , (Timasheff S.N. & Fasman G.D., eds.), Marcel Dekker, New York.
- Van Holde K.E., Blair D., Eldred N. & Arisaka F. (1977): Association equilibria of *CALLIANASSA* hemocyanin. In: Structure and function of haemocyanins (Bannister J.V., ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.22-30.

- van Schaick E.J.M., Schutter W.G., Gaykema W.P.J., van Bruggen E.F.J. & Hol W.G.J. (1981): The crystal structure of the hemocyanin hexamer from PANULIRUS INTERRUPTUS at 5 Angström resolution. In: Invertebrate oxygen binding proteins: Structure, active site and function (Lamy J. & Lamy J., eds.), Marcel Dekker, New York, pp.353-362.
- Vereijken J.M. (1983): Amino acid sequence studies on PANULIRUS INTERRUPTUS hemocyanin: The overlapping BrCN-peptide. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood E.J., ed.). Life Chem. Reports 1, Harwood Acad. Publ., Chur-London-New York, pp.99.
- Waxman L. (1975): The structure of arthropod and mollusc hemocyanins. J.Biol.Chem. 250, No.10, 3796-3806.
- Weber K. & Osborn M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244, 4406-4412.
- Weeke B. (1973): Crossed immunoelectrophoresis. Scand.J.Immunol. 2, Suppl.1, 47-59.
- Young J.D. & Leung C.Y. (1970): Immunochemical studies on lysozyme and carboxymethylated lysozyme. Biochemistry 9, No.14, 2755-2761.
- Zappe H.A., Krohne-Ehrich G. & Schulz G.E. (1977): Low resolution structure of human erythrocyte glutathion reductase. J.Mol.Biol. 113, 141.
- Zatta P. & Salvato B. (1981): The polypeptide chains of CARCINUS MAENAS hemocyanin. In: Invertebrate oxygen binding proteins: Structure, active site and function (Lamy J. & Lamy J., eds.), Marcel Dekker, New York, pp.151-158.

L E B E N S L A U F

- 27.12.1952 geboren als erstes Kind von Hans Stöcker und Erna Stöcker, geb. Frank, beide Angestellte, in Markt Bibart, Mittelfranken
- Sept.1959 Besuch der Volksschule in Markt Bibart
- Sept.1964 Übertritt auf das Gymnasium Scheinfeld
- Mai 1973 Abitur
- 1973-1974 Wehrdienst
- Nov. 1974 Aufnahme des Studiums der Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien an der Universität München
- 1978-1979 Zulassungsarbeit zum Staatsexamen im Fach anorganische Chemie mit dem Thema: "Darstellung und Stabilität von Diazadiboretidinen"
- Herbst 1979 1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien
- Febr.1980 Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Priv.Doz.Dr.J.Markl mit dem Thema: "Immunologische Verwandtschaft und Quartärstruktur von Crustaceenhämocyaninen"
- seit 1.Mai 1981 verheiratet mit Marianne Stöcker, geb. Leitstadler
- 10.10.1983 Geburt unseres Sohnes Fabian
- seit 1.Mai 1984 Wissenschaftlicher Angestellter am Zoologischen Institut der Universität Heidelberg.

München, 1.6.1984

